

Aus der Medizinischen Poliklinik
Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. D. Schlöndorff

**Assoziation des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus mit dem
Krankheitsverlauf bei chronisch-entzündlichen
Darmerkrankungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jens Debler

aus
Ochsenhausen

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. biol. hum. M. Gross

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Kolligs

Prof. Dr. W. Heldwein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. U. Schiemann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2006

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis ulcerosa
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EIM	extraintestinale Manifestationen
Grp	Glucose-reguliertes Protein
HLA	Human Leukocyte Antigen
Hsc	Heat-shock-cognate
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein
HSP	Hitzeschockproteinfamilie
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MC	Morbus Crohn
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple Sklerose
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
OR	OddsRatio
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pst	Providencia stuartii
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF	Tumornekrosefaktor
3'utr	3'-untranslated region
5'utr	5'-untranslated region

1	Einleitung	01
1.1	Hitzeschockprotein-Familie.....	01
1.1.1	Entdeckung und Grundlagen.....	01
1.2	HSP70-Familie.....	03
1.2.1	Genetik.....	03
1.2.2	Struktur.....	06
1.2.3	Funktion.....	07
1.2.4	HSP70 und Entzündung.....	09
1.2.5	HSP70 und Immunologie.....	10
1.2.6	HSP70 und Neoplasien.....	12
1.2.7	HSP70 und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.....	12
2	Patienten, Materialien und Methoden	16
2.1	Patienten und Materialien.....	16
2.1.1	Patienten und Kontrollgruppe.....	16
2.1.2	Chemikalien.....	20
2.1.3	Laborgeräte.....	22
2.1.4	Sonstige Materialien.....	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	DNA-Isolation.....	23
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	25
2.2.3	RFLP-Analyse.....	28

2.2.4	Gelelektrophorese.....	30
2.2.5	Dokumentation.....	32
2.2.6	Statistik.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	M. Crohn-Patienten.....	33
3.1.1	Genotyp- und Allelverteilung.....	33
3.1.2	Alter und Erstdiagnose.....	34
3.1.3	Geschlechterverteilung.....	35
3.1.4	Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung.....	36
3.1.5	Extraintestinale Manifestationen.....	37
3.1.6	Intestinale Verlaufsformen.....	38
3.1.7	Operationen.....	39
3.1.8	Immunsuppressiva.....	40
3.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	41
3.2	Colitis ulcerosa-Patienten.....	42
3.2.1	Genotyp und Allelverteilung.....	42
3.2.2	Alter und Erstdiagnose.....	43
3.2.3	Geschlechterverteilung.....	44
3.2.4	Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung.....	45
3.2.5	Extraintestinale Manifestationen.....	46
3.2.6	Komplikationen.....	47
3.2.7	Immunsuppressiva.....	48
3.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	49

4	Diskussion	50
4.1	HSP70-2 PstI-Polymorphismus - Prävalenz bei CED.....	50
4.2	Assoziation des Polymorphismus mit dem klinischen Verlauf.....	53
4.2.1	Ausdehnung und Lokalisation der Erkrankung.....	53
4.2.2	Extraintestinale Manifestationen.....	55
4.2.3	Intestinaler Verlauf und Therapie.....	56
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	74
8	Danksagung	91
9	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Hitzeschockprotein-Familie

1.1.1 Entdeckung und Grundlagen

Der Grundstein für die Erforschung der Hitzeschockproteine wurde bereits 1962 durch die Versuche von F. Ritossa gelegt. Nach Exposition von *Drosophila busckii* Larven gegenüber Hitze ($\geq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) konnte er an den Polytäanchrosomen (Riesenchrosomen) ein neues Puffing-Muster erkennen. Dieses Muster konnte jedoch auch durch Stoffe wie Dinitrophenol und Salicylat erzeugt werden. Die Puffs entsprechen dabei entspiralisierten DNA-Strängen im Bereich hochrepetitiver Nukleotidsequenzen, an denen mRNA transkribiert wird. Sie sind Ausdruck einer reversiblen Aktivität verschiedener Gene [Ritossa, 1962]. Die entsprechenden Genprodukte konnten 1974 charakterisiert werden. Sie entsprechen sechs Gruppen von Polypeptiden, die ca. 30 % der gesamten intrazellulären Proteinmenge ausmachen, wobei eine der Gruppen allein 15 % stellt [Tissiers et al. 1974]. Diese Proteinklasse wurde folglich, aufgrund ihrer Induzierbarkeit unter anderem durch Hitze, als Hitzeschockproteine bezeichnet. Nach Untersuchung dieser Proteine bei anderen Organismen konnte gezeigt werden, dass es sich bei ihnen um eine hochkonservierte Gruppe von Genprodukten handelt, die bei praktisch allen Organismen vorkommen, was ihre eminent wichtige Bedeutung für Eukaryonten wie Prokaryonten herausstellt [Kregel, 2002]. Die Funktion der induzierbaren Hitzeschockproteine liegt im Erhalt der Integrität der Zelle nach Einwirkung von Stressfaktoren [Becker und Craig, 1994]. Sie assistieren bei der Faltung von Proteinen, schützen Polypeptide vor der Denaturierung, wirken aber auch beim Abbau von irreversibel geschädigten Proteinen mit [Kregel, 2002]. Zellen, die mäßiger Hyperthermie ausgesetzt waren, sind im Anschluss resistenter gegenüber einem konsekutiv schwereren Hitzeschock, aber auch gegenüber verschiedenen anderen Stressoren und zeigen eine höhere Überlebensrate als Zellen, die keiner vorherigen Wärmebehandlung exponiert waren [Feige und Polla, 1994]. Dieses Phänomen wird auch als erworbene Thermotoleranz (acquired thermotolerance) bezeichnet [Georgopoulos und Welch, 1993]. Wie schon Ritossa feststellte, lässt sich die Hitzeschockantwort nicht nur durch Temperaturerhöhung sondern auch durch diverse chemische und biologische Agentien provozieren.

Inzwischen sind über 100 solcher Stressoren bekannt. Hierbei wird zwischen Stoffen unterschieden, die nur in bestimmten Organismen oder Organen eine Hitzeschockantwort hervorrufen können und solchen, die generell in allen Organismen eine Induktion dieser Proteine bewirken [Nover, 1990 I]. Bekannte Stimulatoren sind Schwermetalle wie Cd^{2+} , Cu^{2+} , Dinitrophenol, Arsenit, Ethanol, Aminosäureanaloga, $\text{TNF-}\alpha$, Virusinfektionen, Sauerstoffradikale und viele mehr [Nover, 1990 I, Kregel, 2002]. Aufgrund der Auslösbarkeit der Hitzeschockantwort durch eine Vielfalt von Stressoren wird auch allgemein von Stressproteinen gesprochen [Welch, 1992, Ananthan et al. 1986]. Der Mechanismus, durch den ihre Expression ausgelöst wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Er beginnt vermutlich mit der Denaturierung von Zellproteinen, bei der hydrophobe Aminosäuren präsentiert werden, an die die Hitzeschockproteine binden können, was einen Abfall an freien Schockproteinen bewirkt [Sztankay et al. 1993]. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, sogenannte Hitzeschockfaktoren (HSF), die wiederum an die genomische DNA binden können und dort die Transkription der Stressproteine auslösen [Morimoto und Milarski, 1990]. Auf der Suche nach dem „Genschalter“ konnte Pelham nach Analyse mehrerer Hitzeschockgenpromoterbereiche eine Nukleotidsequenz definieren, die sich mehr oder weniger perfekt bei allen untersuchten Genen findet: 5'-CTGGAATnTTCTAGA-3' (n für ein beliebiges Nukleotid) [Pelham, 1982]. Damit war das eigentliche Hitzeschockpromoterelement (HSE) gefunden. Heute wissen wir, dass die optimale HSE-Variante aus repetitiven Strukturen wechselnder Purin- bzw. Pyrimidin-Motiven besteht, z. Bsp.: 5'-GAAnnTTCnnGAA-3' oder 5'-TTCnnGAAnnTTC-3' [Nover, 1990 II]. Neben den durch Hitze und verschiedenen Stoffen induzierbaren Proteinen gibt es auch „Stressproteine“, die eine permanente, konstitutive Expression in bestimmten Organismen und Geweben zeigen. Um diese Proteine von den stressinduzierten, eigentlichen Hitzeschockproteinen zu unterscheiden, werden sie auch als Heat-shock-cognates (Hsc) bezeichnet [Becker und Craig, 1994]. Die konstitutiv exprimierten Proteine (z. Bsp. Hsc70) haben unter physiologischen Bedingungen wichtige Aufgaben im Bereich der Faltung und im Transport von neu synthetisierten, unreifen Polypeptiden [Burel et al. 1992]. Heute werden die Hitzeschockproteine in eine Multigenfamilie mit mehreren Mitgliedern eingeteilt (Tab 1.2). Aufgrund der hohen evolutionären Konservierung der Stressproteine können experimentelle Ergebnisse häufig auch auf andere biologische Systeme übertragen werden [Nover, 1994].

Die Stressproteine werden üblicherweise aufgrund ihrer Molekulargröße unterschieden [Sztankay et al. 1993], eine allgemein gültige Klassifikation und Nomenklatur der Hitzeschockproteine besteht jedoch noch nicht. Die Familien werden hier mit HSP und die einzelnen Vertreter mit Hsp gekennzeichnet. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die humane HSP70-Familie, insbesondere auf Hsc70 und das stressinduzierbare Hsp70 (Hsp72), das auf Chromosom 6 codiert wird, gelegt [Milner und Campbell, 1990].

1.2 HSP70-Familie

1.2.1 Genetik

Die HSP70-Familie ist eine weit verbreitete Genfamilie mit mehreren Vertretern, die bei vielen Organismen, sowohl Vertebraten als auch Invertebraten, vorkommt [Günther und Walter, 1994]. So besteht zum Beispiel die HSP70-Familie von *Drosophila melanogaster* aus neun Mitgliedern [Günther und Walter, 1994]. Im Gegensatz hierzu gibt es bei *E. coli* mit dem DnaK jedoch nur einen Vertreter dieser Familie [Hunt und Morimoto, 1985]. Eine Unterscheidung der verschiedenen Repräsentanten ist aufgrund mehrerer Parameter möglich: Ubiquitäre versus gewebsspezifische Expression, subzelluläre Lokalisation der Proteine oder konstitutive versus induzierbare Expression [Günther und Walter, 1994]. Bemerkenswert ist das gehäufte Vorkommen von intronlosen Genen insbesondere bei den hitzeinduzierbaren Formen [Welch, 1992]. Beim Menschen können innerhalb des MHC (Major Histocompatibility Complex) drei Gene der HSP70-Familie lokalisiert werden: Hsp70-1, Hsp70-2 und Hsp70-Hom. Sie liegen zwischen den Genen für Komplementfaktor C2 und TNF- α [Milner und Campbell, 1990]. Die drei genannten Gene entstanden wahrscheinlich durch den Mechanismus der Genduplikation vor über 70 Millionen Jahren [Walter et al. 1994]. Die Lokalisation von HSP70-Genen innerhalb des MHC zieht sich durch mehrere Arten [Walter et al. 1994]. Es ist jedoch nicht entschieden, ob dies Ausdruck einer gemeinsamen Abstammung ist oder aufgrund eines funktionellen Mechanismus entstanden ist [Günther und Walter, 1994]. Die Gene enthalten keine Introns und codieren für Proteine bestehend aus 641 Aminosäuren. Hsp70-1 ist hitzeinduzierbar, zeigt aber auch eine geringe konstitutive Expression.

Hsp70-2, das 8 kb von Hsp70-1 entfernt liegt, codiert für das identische Protein (Hsp72) wie sein Nachbar, die Gene unterscheiden sich jedoch in ihren 5'utr und 3'utr sowie in der codierenden Sequenz [Milner und Campbell, 1992]. Innerhalb der codierenden Hsp70-2-Sequenz befindet sich an Position 1267 ein A/G-Transitionspolymorphismus, der jedoch zu keinem Aminosäurenaustausch im fertigen Protein führt. Hsp70-2 wird ubiquitär nur nach Hitzeschock exprimiert [Milner und Campbell, 1990]. Das dritte Gen, Hsp70-Hom, liegt 4 kb von Hsp70-1 entfernt und unterscheidet sich durch die konstitutive Expression in den Testes von den anderen beiden Vertretern, dieser im MHC lokalisierten Gene [Milner und Campbell, 1990, Günther und Walter, 1994]. Der Promoter der meisten HSP70-Gene ist ungefähr 200 Nukleotide vom Transkriptionsstart entfernt und hat eine Länge von 200 Nukleotiden [Günther und Walter, 1994]. Das charakteristische Motiv des Promoters ist das repetitiv vorhandene Hitzeschockelement, das für die Hitzeinduzierbarkeit essentiell ist [Morimoto und Milarski, 1990]. Die induzierte Stressantwort scheint dabei proportional zu Dauer und Ausmaß des Stressors zu sein [Feige und Polla, 1994]. Bisher wurden bei Vertebraten vier verschiedene Transkriptionsfaktoren beschrieben [Pirkkala et al. 2001]. Der monomere HSF1, der während normaler Temperaturen eine cytosolische Verteilung zeigt, wird bei Hyperthermie phosphoryliert, kann trimerisieren und erlangt DNA-Bindungsfähigkeit, woraufhin HSF1 ein nukleäres Verteilungsmuster zeigt und die Transkription der Hitzeschockproteine auslöst [Feige und Polla, 1994] (Abb. 1.1). Die Regulation der Expression findet jedoch auch posttranskriptionell statt [Nover, 1987, Kregel, 2002]. Neben der induzierenden Wirkung auf die Stressproteinexpression können die Hitzeschockfaktoren aber auch die Expression von TNF- α und anderen Zytokinen hemmen [Pirkkala et al. 2001]. Neben den induzierbaren Formen der 70 kDa-Familie gibt es noch einen weiteren Vertreter, der konstitutiv exprimiert wird: Das Hsc70 wird von einem intronhaltigen Gen kodiert, die genaue Anzahl der Gene für Hsc70 ist jedoch noch nicht bekannt, da mehrere, zum Teil auch prozessierte Pseudogene existieren [Sorger und Pelham, 1987]. Es zeigt eine ubiquitäre konstitutive Expression und stellt 1 % der intrazellulären Proteinmenge, nach Hitzeschock wird es nur gering vermehrt exprimiert [Sorger und Pelham, 1987]. Das Hsc70-Protein zeigt eine sehr hohe Homologie mit dem hitzeinduzierbaren Hsp72 [Brown et al. 1993], so dass ähnliche Funktionen dieser beiden Proteine angenommen werden können [Becker und Craig, 1994], die ATP-abhängig gemischte Dimere bilden [Brown et al. 1993]. Das codierte Polypeptid wandert in der Elektrophorese etwas langsamer als Hsp72 und wird deshalb oft als Hsc73 bezeichnet.

Neben diesen gut erforschten Vertretern der HSP70-Familie gibt es noch eine Reihe von weiteren Genen, die auf den Chromosomen 1, 5, 9, und 12 lokalisiert sind und aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und Größe ihrer Genprodukte zu dieser Gruppe gerechnet werden müssen. (Tab. 1.1)

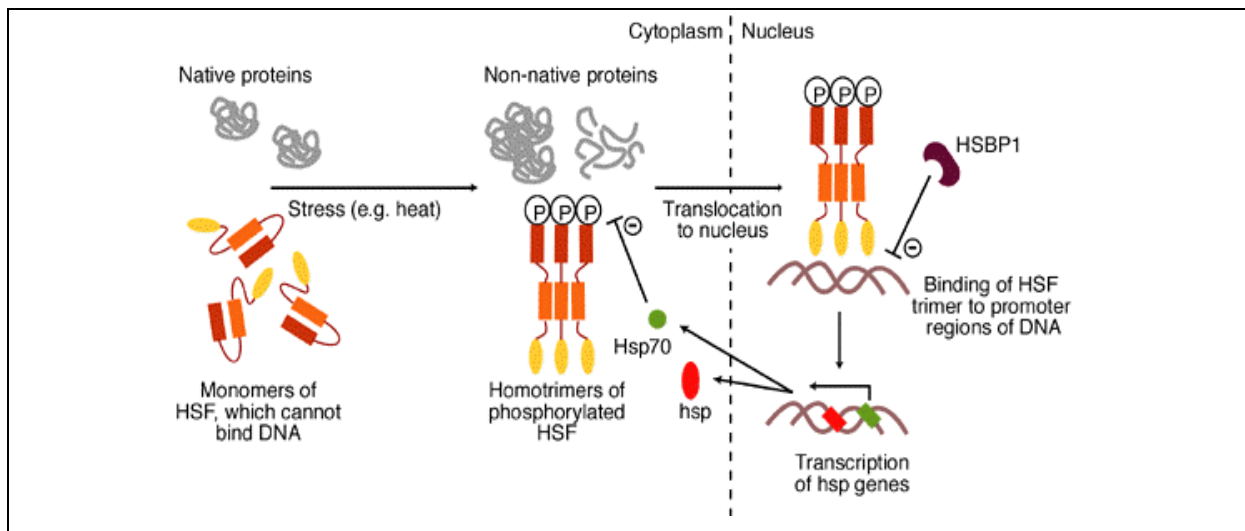


Abb. 1.1 Regulation der Hsp70-Genexpression [Pockley, 2001]

Freies Hsp70 hemmt die Bildung von phosphorylierten HSF-Homotrimeren, HSBP-1 hemmt die Bindung von HSF an Hitzeschockgenpromoter.

Abk.: HSBP1= Hitzeschockprotein-bindendes Protein, HSF=Hitzeschockfaktor, hsp= Hitzeschockprotein

Tab. 1.1 Genvertreter der HSP70-Familie [Günther und Walter, 1994]

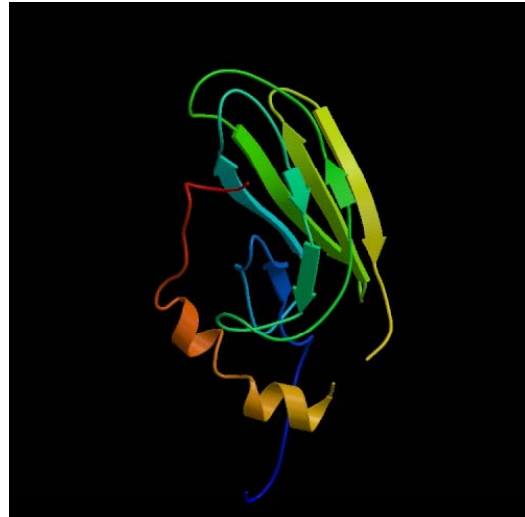
Gen	Chromosom	Expression		
		Gewebe	Lokalisation	Modus
Hsp70-1	6p21	ub	cyt, nuc	c, hs
Hsp70-2	6p21	ub	cyt, nuc	hs
Hsp70-Hom	6p21	Testis		c
HspA6	1q	ub		hs
HspA7	1q	ub		hs
Hsc70	?	ub	cyt, nuc	c
GRP78(BiP)	9q	ub	er	c, gluc
PBP74			cyt	c
Hsp70RY	5q31		cyt	c
STCH		ub	cyt	c

Abk.: ub=ubiquitär, cyt=Cytosol, nuc=Nukleus, c=konstitutiv, hs=hitzeschockinduziert, gluc=glucosereguliert
er=Endoplasmatisches Retikulum

1.2.2 Struktur

Gemeinsames Merkmal der exprimierten Proteine ist eine Größe von ca. 70 kDa, wobei bedingt durch die Bestimmungsmethoden verschiedene Namen für ansonsten identische Proteine existieren (das hitzeinduzierbare Hsp70 wird unter anderem auch als Hsp68 oder Hsp72 bezeichnet) [Günther und Walter, 1994]. Die verschiedenen Proteine zeigen sowohl innerhalb einer Art als auch zwischen verschiedenen Spezies große Sequenzähnlichkeiten, wobei die Übereinstimmungen zwischen den Proteinen innerhalb einer Art geringer sind als zwischen den homologen Proteinen verschiedener Spezies. Die Sequenzübereinstimmungen sind dabei n-terminal höher als am c-terminalen Ende [Günther und Walter, 1994]. Diese Ähnlichkeit setzt sich auch auf der DNA-Ebene fort [Hunt and Morimoto, 1985]. Die 70 kDa-Hitzeschockproteine bestehen aus zwei Hauptdomänen. N-terminal befindet sich eine ca. 450 Aminosäuren lange, ATP-spaltende Domäne und am c-terminalen Ende befindet sich eine ca. 200 Aminosäuren große Substrat-Bindungsdomäne.

Manche Vertreter der HSP70-Familie haben am n-terminalen Ende eine Zielsequenz, die das Protein an ihr subzelluläres Ziel (Mitochondrium, endoplasmatisches Retikulum) dirigiert [Feige und Polla, 1994]. Aufgrund von kristallographischen Untersuchungen konnte ein Bild der Proteinkonformation entworfen werden (Abb. 1.2).



42 kDa ATP-spaltende n-terminale Domäne

18 kDa Substrat-bindende c-terminale Domäne

Abb. 1.2 Konformation der HSP70 [Morshauser et al. 1999, Osipiuk et al. 1999]

Das Modell der Substrat-bindenden Domäne entspricht dem Hsc70 der Ratte.
Die n-terminale ATP-spaltende Domäne entspricht dem Hsc70 des Menschen.

1.2.3 Funktion

Hitzeschockproteine stellen circa 5-10 % des intrazellulären Proteinpools und können in Stresssituationen bis zu 15 % der zellulären Proteinmenge stellen [Pockley, 2001]. Ein funktionstüchtiger Zellstoffwechsel scheint daher nur mit diesen Proteinen möglich zu sein [Feige und Polla, 1994]. Eine Theorie zur Funktion des Hsc70 ist die Bindung dieses Proteins an frisch am Ribosomenapparat synthetisierte Polypeptide, wobei dadurch eine prämatüre Faltung des Peptids verhindert wird [Burel et al. 1992]. Bei Proteinen, die in anderen Zellkompartimenten (Mitochondrium, endoplasmatisches Retikulum) Funktionen erfüllen, ermöglicht diese Faltungshemmung möglicherweise einen Transport vom Ort der Synthese in das gewünschte Zellkompartiment [Craig, 1993]. Nach erfolgter Translokation können die Hsc70-Moleküle sich lösen und stehen wieder anderen, neusynthetisierten Polypeptiden im Cytosol zur Verfügung.

Die Loslösung gebundener Peptide von HSP70-Vertretern benötigt eine Bindung und Hydrolyse von ATP [Becker und Craig, 1994]. In den subzellulären Organellen wird die Hemmung der prämaternen Faltung dann wahrscheinlich durch andere Vertreter der HSP70-Familie übernommen, bis der definitive Bestimmungsort des Peptids erreicht ist, an dem das „reife“ Protein seine funktionstüchtige Konformation einnimmt [Welch, 1992]. Tatsächlich konnte eine Störung der Proteintranslokation innerhalb der Mitochondrien aufgrund eines defekten HSP70-Vertreters (Grp75) nachgewiesen werden [Kang et al. 1990]. Dieses so beschriebene Konzept wird in der Molekularbiologie als das „Molekulare Gouvernanten“- (Molecular Chaperons) Modell bezeichnet. Chaperone sind Hilfsproteine, die bei der Selbstfaltung und Assemblierung anderer Polypeptide assistieren und dabei eine fehlerhafte Faltung verhindern können [Ellis, 1987]. Die Chaperone sind dabei weder Bestandteil des reifen Proteins, noch enthalten sie Informationen über die Faltung des reifen Peptids [Ellis und van der Vies, 1991]. Die endgültige, „physiologische“, dreidimensionale Struktur wird nur durch die Aminosäuresequenz festgelegt [Ellis et al. 1989]. Hitzestress bewirkt in der Zelle eine Reihe von Veränderungen in Zellkatabolismus, Proteinbiosynthese und Ultrastruktur [Welch, 1992]. Elektronenmikroskopische Bilder des Zellkerns zeigen als Antwort auf die Hyperthermie eine Aggregation von Präribosomen und anderer Ribonukleoproteine im Nukleolus [Nover, 1990 II]. Nach Hitzeschock zeigen die Stressproteine (Hsp72 und Hsc70) ein vermehrt nukleäres, insbesondere nukleoläres Verteilungsmuster [Nover, 1990 II]. Unter der Annahme, dass die Stressproteine an unreife/denaturierte Polypeptide binden, wäre es möglich, dass ihre vermehrte nukleoläre Konzentration als Folge der Akkumulation von unreifen Präribosomen entsteht [Welch, 1992]. Ob Hsp72 (bzw. Hsc70) bei der Rückfaltung hilft oder die Peptide nur vor einer Aggregation schützt ist noch nicht sicher entschieden. Während des Restitutionsvorganges der Zelle kommt es wieder zu einer Rückverteilung der Stressproteine in das Cytosol [Welch, 1992]. Auch im Cytosol binden Hsp72 und Hsc70 wahrscheinlich an reife, durch verschiedene Stressoren denaturierte Polypeptide: Durch einfache Injektion eines Gemisches aus denaturierten Proteinen in eine Zelle kann eine Stressantwort mit vermehrter cytosolischer Expression von HSP70-Vertretern getriggert werden [Anathan et al. 1986]. Das konstitutiv exprimierte Hsc70 zeigt darüber hinaus Funktionen in Translokation und/oder Proteolyse von Polypeptiden in Lysosomen [Terlecky et al. 1992, Terlecky, 1994] und im Uncoating von Clathrin-Vesikeln [Becker und Craig, 1994]. Auch im Blut lässt sich zirkulierendes Hsp72 nachweisen [Pockley et al. 1998], Erläuterungen hierzu in den Kapiteln 1.2.5 und 1.2.6.

1.2.4 HSP70 und Entzündung

Inflammation ist als eine Reaktion des Organismus auf die unterschiedlichsten exo- und endogenen Pathogene (Krankheitserreger, Fremdkörper, Autoimmunogene, etc...) zu verstehen. Zentraler Mechanismus der Entzündung ist die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Interleukine (Il-1, Il-6) und TNF- α . Daneben sezernieren aktivierte Entzündungszellen des Monozyten-Makrophagensystems reaktive Sauerstoffspezies (H_2O_2 , OH-Radikale), die zu einer Elimination des Pathogens führen sollen, jedoch auch häufig Gewebsschäden verursachen. Diese Radikale induzieren aber in den Zellen auch die Expression von Stressproteinen, die dann zytoprotektive Funktionen übernehmen können [Jaquier-Sarlin et al. 1994]. Ein Phänomen bei alternden Zellen ist die mangelhafte Induzierbarkeit der Stressproteine im Vergleich zu jungen Zellen. Dies könnte unter anderem Grund sein für die Beobachtung, dass ältere Organismen empfindlicher auf Stressoren reagieren [Heydari et al. 1994]. Bei Monozyten, die mit milder Hitze vorbehandelt waren, können nach einer Behandlung mit H_2O_2 geringere Schäden an Zell- und Mitochondrienmembranen festgestellt werden als bei Kontrollzellen, die keine Hitzevorbehandlung erfahren haben [Jaquier-Sarlin et al. 1994]. TNF- α ist ein Zytokin, das bei akuten und chronischen Entzündungen den inflammatorischen Prozess verstärken und unterhalten kann. Bei Mäusen, die mit hohen Dosen von TNF- α behandelt werden, lässt sich durch eine vorhergehende Erhöhung der Körpertemperatur eine Steigerung der Überlebensrate erzielen, wobei dieser Effekt verloren geht, wenn Hsp72-knockout Mäuse verwendet werden [van Molle et al. 2002]. Neben dem entzündungsfördernden Effekt hat TNF- α auch eine lytische Wirkung auf verschiedene Tumorzellen. Hier konnte eine schützende Wirkung durch eine Hitzevorbehandlung nachgewiesen werden: Fibrosarkomzellen der Maus (WEH-543) wurden einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt. Nach einer Behandlung mit TNF- α zeigen diese Zellen eine 50 % höhere Überlebensrate als Sarkomzellen ohne Hitzevorbehandlung. Dieser Effekt verliert sich nach zwei Tagen und ist mit der Kinetik der HSP70 hoch korreliert [Jaattela et al. 1989]. Eine weitere protektive Rolle von Hsp72 zeigt sich in verschiedenen Sepsismodellen [Bruemmer-Smith et al. 2001].

Hitzeschock bewirkt eine verminderte Induzierbarkeit von IL-1 und TNF- α [Hall, 1994], [Schmidt und Abdulla, 1988], so dass vermutet wurde das HSP-Vertreter die Expression dieser Zytokine hemmen. Es zeigte sich jedoch, dass dies kein direkter Effekt der Hitzeschockproteine ist [Hall, 1994]. Wie im Abschnitt 1.2.3 bereits angedeutet lässt sich auch im Serum extrazelluläres Hsp72 nachweisen: Dieses Protein kann durch die Bindung an einen Zellmembranrezeptor auf Monozyten die Ausschüttung von TNF- α , IL-1 und IL-6 bewirken [Asea et al. 2000] (Abb. 1.3). Deshalb wird in der Literatur das Hsp72 nun auch, in Anlehnung an seine klassische Funktion als intrazelluläres Chaperon, als „Chaperokin“ bezeichnet. Extrazelluläres Hsp72 könnte somit als systemischer Signalgeber für bestimmte zellgebundene Pathologien dienen, bei denen Hsp72 freigesetzt wird [Asea et al. 2000].

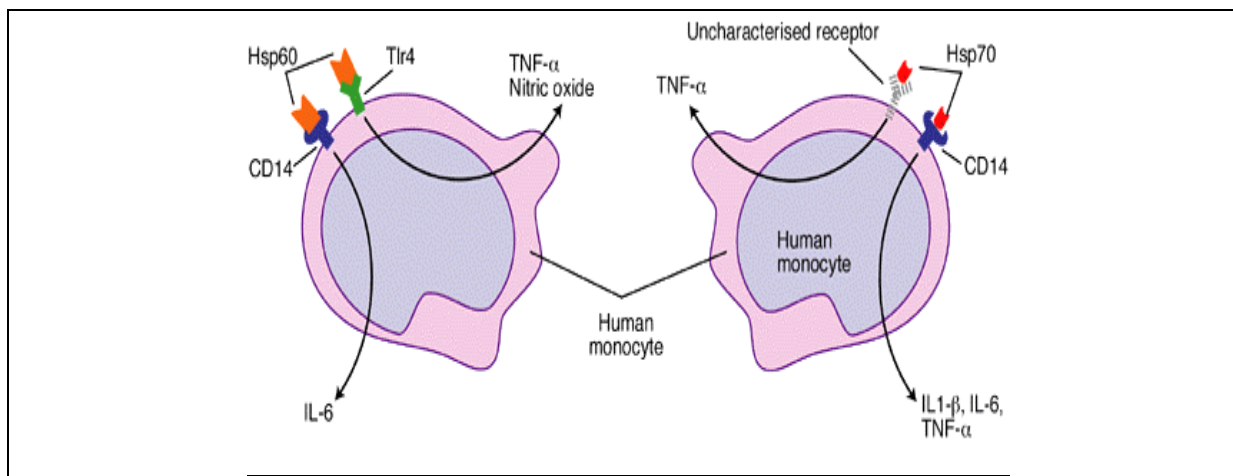


Abb. 1.3 Extrazell. Funktion von Hsp72 (Hsp70) [Pockley, 2001]

Hsp72 (Hsp70) und Hsp60 induzieren über zum Teil noch nicht näher charakterisierte Membranrezeptoren die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen.

1.2.5 HSP70 und Immunologie

In einen Fremdorganismus eingedrungene Erreger erfahren durch die Änderung des Umgebungsmilieus (Temperatur, pH, Nährstoffkonzentrationen) und die Abwehrreaktion des Wirtsorganismus (ROS, Zytokine, Makrophagen) eine Stresssituation, die in den Erregern zu einer vermehrten Expression von Hitzeschockproteinen führt. Diese ermöglichen den Eindringlingen eine Anpassung an die neuen Verhältnisse [Maresca und Kobayashi, 1994].

Gleichzeitig kommt es durch die vom Wirt ausgelöste Entzündungsreaktion auch zu einer Induktion der Stressproteine in den Wirtszellen [Kregel, 2002]. Die HSP erfüllen also vermutlich sowohl in pathogenen Organismen als auch im Wirt eine protektive Rolle.

Die Hitzeschockproteine sind „immunodominante“ Antigene. So konnten bei verschiedenen Parasitosen des Menschen sowohl erregerspezifische HSP70-Antikörper wie auch eine zellgebundene Immunität gegen HSP70-Vertreter nachgewiesen werden [Maresca und Kobayashi, 1994]. Aufgrund der hohen Homologien der Stressproteine zwischen den Arten wäre die Triggerung einer Autoimmunkrankheit durch Infektionen denkbar. Über die immunopathologische Rolle der Stressproteine existieren drei verschiedene Modellvorstellungen [Res et al. 1991]: Im ersten Modell kommt es durch eine überschießende Immunreaktion gegen körperfremde Hitzeschockproteine zu einer Einbeziehung der Wirtsorgane in den Entzündungsprozess, was als Autoimmunprozess fehlgedeutet werden kann. Die zweite Möglichkeit ist die Triggerung einer Immunreaktion gegen körpereigene Hitzeschockproteine, ausgelöst durch fremde Stressproteine, die jedoch untereinander hochkonservierte Domänen haben. Als letzte Möglichkeit wäre eine primäre Immunreaktion gegen eigene Stressproteine, ohne vorherige Induktion durch fremde Proteine denkbar. Für diese drei Modelle gibt es zum Teil widersprüchliche Belege und der Streit über die Rolle der Stressproteine in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten ist noch nicht beendet [Res et al. 1991, Yang und Feige, 1992], denn es existieren auch Belege, die eher für eine protektive Rolle im Rahmen von Autoimmunkrankheiten sprechen [van Eden et al. 1998, Pockley, 2001]. Ein Beispiel für eine mögliche Beteiligung von HSP70 bei Autoimmunkrankheiten des Menschen ist das Vorkommen von Autoantikörpern gegen Hsc70 bei Patienten mit systemischen Lupus erythematodes und von Hsp70-autoreaktiven T-Zellen bei MS-Patienten [Minota et al. 1988, Salveti et al. 1996]. Über ihre Bedeutung als Antigene hinaus wird eine Rolle von HSP70-Vertretern in der Antigenpräsentation vermutet [De Nagel und Pierce, 1993] und experimentelle Impfversuche mit Komplexen aus Antigen und HSP70 deuten auf eine mögliche therapeutische Rolle als natürliches Adjuvans hin [Del Giudice, 1994]. Neuere Untersuchungen im Bereich der unspezifischen Immunität ergaben, dass Hsp72 und auch HSP60-Vertreter Komplement aktivieren können, wobei die Aktivierung durch Hsp72 unabhängig von Antikörpern abläuft. Dies bedeutet, dass extrazelluläre Stressproteine ein wichtiges immunologisches Teilsystem beeinflussen können und damit wesentlich zum immunologischen „Klima“ und zur Erkennung von nekrotischem oder infiziertem Gewebe beitragen [Prohaszka et al. 2002].

1.2.6 HSP70 und Neoplasien

Spekulationen über eine Beteiligung der HSP70-Familie in der Pathogenese von Neoplasien lieferten Beobachtungen, dass HSP70-Vertreter an das Tumorsuppressorprotein p53 binden können und dabei vermutlich eine Konformationsregelung dieses Moleküls übernehmen [Pinhasi-Kimhi et al. 1986, Hainaut und Milner, 1992]. Erhöhte Mengen an HSP70 finden sich bei diversen malignen Zelllinien [Jolly und Morimoto, 2000] und für das Hsp72 konnte eine apoptosehemmende Wirkung gezeigt werden [Beere et al. 2000], wobei diese Wirkung durch eine Hemmung von proapoptotischen Enzymen ausgelöst wird [Mosser et al. 1997]. Diese Tatsache könnte sich kontraproduktiv in der Tumorthherapie auswirken, da die Tumorzellen resistenter gegenüber einer tumoriziden Behandlung sein könnten [Mosser et al. 1997]. Andererseits exprimieren verschiedene Tumorzelllinien Hsp72 auf ihrer Oberfläche, während bei normalen Zellen kein Hsp72 auf der Zelloberfläche zu finden ist, so dass dies ein tumorspezifischer Vorgang ist, der vermutlich vom Immunsystem zur Erkennung von transformierten Zellen genutzt wird [Multhoff et al. 1995]. Tatsächlich erkennen NK-Zellen das Hsp72 und bewirken die Lyse dieser Zellen [Botzler et al. 1996, Multhoff et al. 1997]. Außerdem hat das Hsp72 in verschiedenen Tumormodellen einen stimulierenden Einfluss auf die Entwicklung einer tumorspezifischen, T-Zell-gebundenen Immunität und bewirkt eine Infiltration des Tumors mit Makrophagen und Lymphozyten [Todryk et al. 1999].

1.2.7 HSP70 und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Bei M. Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) handelt es sich um chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit Inzidenzraten in der Bevölkerung von 6,1/100000 (M. Crohn) und 10,4/100000 (Colitis ulcerosa) sowie Prävalenzen von 70/100000 (MC) und 100/100000 (CU), die sich durch eine schwere Entzündung der Darmwand auszeichnen [Ekbohm et al. 1991, Satsangi et al. 1998]. Bei der Colitis ulcerosa beschränkt sich die Entzündung in kontinuierlicher Ausprägung auf die Colonmukosa und/oder Submukosa [Farmer et al. 1993], wohingegen beim M. Crohn praktisch der ganze Gastrointestinaltrakt, hauptsächlich jedoch das Ileum und Colon, in segmentaler Ausprägung (skip lesions) befallen sein kann [Farmer et al. 1975, Stahl et al. 1998].

Die Folgen dieses inflammatorischen Geschehens sind sekundäre Malabsorption und bei M. Crohn eine Entwicklung von Abszessen und Fisteln, die wiederum Folgeoperationen nach sich ziehen können [Farmer et al. 1975, Greenstein et al. 1988]. Neben diesem Entzündungsfokus im Intestinaltrakt kommt es bei beiden Erkrankungen auch zu extraintestinalen Manifestationen, die der eigentlichen Darmentzündung lange vorausgehen können. Sie äußern sich hauptsächlich in Arthritiden, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, oralen Aphten und Augenerkrankungen wie Konjunktivitis oder Iridozyklitis [Greenstein et al. 1976, Veloso et al. 1996]. Eine wichtige Therapieoption bei CED ist die Gabe von antiinflammatorischen und/oder immunsuppressiven Medikamenten [O'Brien et al. 1991, D'Haens et al. 1999]. Die genaue Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, diskutiert werden aber infektiöse, autoimmunologische und hereditäre Ursachen [Toyoda et al. 1993, Bouma et al. 1998, Schreiber und Schottelius, 2000, Bonen und Cho, 2003]. Aufgrund der protektiven Wirkung der Hitzeschockproteine in Entzündungsgeschehen [Jacquier-Sarlin et al. 1994], das mit einer Produktion von ROS und Zytokinen abläuft [Papadakis und Targan, 2000], wäre eine Beteiligung der Stressproteine im Verlauf der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen möglich. Tatsächlich können in Darmmukosa von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Konzentrationen an Hsp72 und Hsc70 festgestellt werden [Ludwig et al. 1999, Stulik et al. 1997]. Die Expressionsrate bei den Colitis ulcerosa-Patienten ist dabei noch ausgeprägter als bei den M. Crohn-Patienten [Ludwig et al. 1999]. Bei Crohn-Patienten wird im Mukosaepithel vermehrt Hsp72 und Hsc70 exprimiert, wohingegen in mukösen und submukösen monozytären Zellen nur das Hsc70 vermehrt exprimiert wird. Die Colitis ulcerosa-Patienten zeigen, bis auf eine geringere Hsc70 Produktion in monozytären Zellen, ein ähnliches Expressionsmuster wie M. Crohn-Patienten [Ludwig et al. 1999]. Für einen anderen Vertreter der HSP-Familie, das Hsp60, findet sich in Darmschleimhaut von Crohn-Patienten ein fast identisches Expressionsmuster wie in gesunden Kontrollen [Baca-Estrada et al. 1994]. Bei Colitis ulcerosa-Patienten scheint das Hsp60 vermehrt in Darmepithelien exprimiert zu werden [Winrow et al. 1993]. Untersuchungen zur Mukosa-Expression des Hsp90 bei M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten liefern sehr ähnliche Werte wie in Darmschleimhaut gesunder Probanden [Stahl et al. 1998].

Aufgrund der hohen Konservierung der Hitzeschockproteine zwischen den Organismen wurde eine Rolle der Hitzeschockproteine als Autoimmunogen in der Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankungen vermutet [Markesich et al. 1991, Reumaux et al. 1995]. Im Serum und in der Mukosa von Colitis ulcerosa- und M. Crohn-Patienten lassen sich in der Tat Antikörper gegen HSP70-Vertreter nachweisen [Ludwig et al. 1999]. Eine Detektion von Antikörpern in gleicher Höhe gelingt jedoch auch bei gesunden Kontrollpersonen [Pockley et al. 1998, Ludwig et al. 1999]. Für das Hsp60 lässt sich keine erhöhte zelluläre Autoreaktivität bei M. Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigen [Baca-Estrada et al. 1994]. Eine Funktion der Hitzeschockproteine und der HSP70 im Besonderen als Autoimmunogen in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist zusammengefasst damit eher unwahrscheinlich. In weiteren Studien konnte eine protektive Funktion von Hsp72 gegenüber Hitze und oxidierenden Substanzen in intestinalen Schleimhautzellen (IEC-18) nachgewiesen werden [Musch et al. 1996, Burrell et al. 1997, Wischmeyer et al. 1997]. Somit könnten die HSP70 auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine protektive Rolle übernehmen. Dieser Hypothese zufolge würde eine höhere Expression von Stressproteinen mit einer geringeren Inzidenz und/oder mit einem milderem Verlauf einer entzündlichen Darmerkrankung einhergehen. In Expressionsstudien des Hsp70-2 Gens auf Chromosom 6, das für Hsp72 codiert [Milner und Campbell, 1990], konnte in Abhängigkeit von einem PstI-Polymorphismus innerhalb der codierenden Sequenz nach Hitzeschock eine erniedrigte Konzentration an induzierbarem Hsp72 nachgewiesen werden [Pociot et al. 1993]. Erste Untersuchungen bei japanischen M. Crohn-Patienten deuten auf eine positive Korrelation des Polymorphismus (Allel B) mit einem schweren klinischen Verlauf der Erkrankung hin [Esaki et al. 1999]. Darüberhinaus ist dieser Polymorphismus mit einem IDDM (Diabetes mellitus) assoziiert [Pugliese et al. 1992]. Eine Evaluation dieser Ergebnisse bei kaukasischen Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der Prävalenz dieses PstI-Polymorphismus bei kaukasischen Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa und die Analyse des Krankheitsverlaufs in Abhängigkeit von diesem Polymorphismus. Eine Korrelation zwischen diesem Genpolymorphismus und dem Verlauf chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen könnte in der klinischen Praxis Verwendung finden als Genmarker für das Erkrankungsrisiko und den Verlauf dieser Erkrankungen.

Tab. 1.2 HSP-Großfamilie

modifiziert nach [Nover 1990 I+II, Sztankay et al. 1993, Morimoto et al. 1994]

Familie	Vertreter	Expression	Funktion und Eigenschaften
HSP100	Hsp110 [ClpA, B, C]	c/hs	Schutz von Nukleoproteinen bei Stress, ATP-bindend
HSP90	Hsp90 [HtpG]	c/hs	Regulation von Steroidrezeptoren und Proteinkinasen, ATP- und Calmodulin-bindend
	Grp94	c/hs	Faltung und Aufbau sekretorischer Proteine im ER ATP- und Calmodulin-bindend
HSP70	Hsp72 [DnaK] (Hsp70)	hs	Faltung, Topogenese und Translokation von Proteinen, Schutz zytoplasmatischer und nukleärer Proteine bei Stress, ATP-bindend hohe Affinität zum Zytoskelett
	Hsp73 (Hsc70, Clathrin uncoating ATPase Hsp72/74 (PBP)	c/hs	Faltung, Topogenese und Translokation von Proteinen, 95 % Homologie zu Hsp72
	Grp75	c	Antigenpräsentation
	Grp78 (BiP)	c/grp	Faltung und Topogenese mitochondrialer Proteine
		c/grp	Aufbau von Ig und sekretorischer Proteine im ER
HSP60	Hsp60 (Hsp58)	c/hs	Faltung und Aufbau mitochondr. Enzymkomplexe ATP-bindend, Zusammenarbeit mit Grp75
	Hsp65 [GroEL]	c/hs	Proteinfaltung, Zusammenbau multimerer Komplexe, Mikrobenantigen (common antigen) ATP-bindend, oft als heptamerer Komplex
HSP 40	Hsp47 [DnaJ]	c/hs	substratbindende Subunit des HSP70/40-Komplex
HSP28	Hsp28	c/hs	Regulation des Zellwachstums
HSP23	[GrpE]	c/hs	bei E. coli: Teil des DnaK/J-GroEL/S-Systems
HSP20	IbpA, IbpB	c/hs	Schutz von entfalteten Proteinen, Interaktion mit Aktin-System, Teil zytoplasm. mRNP-Komplexe
HSP10	Hsp10 [GroES]	c/hs	Steuerung des Hsp65, oft als heptamerer Komplex
HSP8,5	Ubiquitin	c/hs	nichtlysosomale Proteindegradation (Marker) Modifikation von Proteinfunktionen von z. Bsp. Histon H2A oder Membranproteinen
Immunophiline (2 Familien)		c/hs	Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität
Abk : (...): Synonym [...]: entspr. bakt. Genprodukten c: konstitutiv hs: hitzeinduziert grp: glucosereguliert ER: Endoplasmatisches Retikulum L/S: large/small Ig: Immunglobuline Clp: Catalytic protease HtpG: High temperature protein G Grp: glucosereguliertes Protein PBP: peptidbindendes Protein BiP: Ig-bindendes Protein DnaK/J: HSP70 bei E. coli GroEL: HSP60 bei E. coli Ibp: Ig-bindendes Protein RNP: Ribonukleoproteine			

2 Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Patienten und Materialien

2.1.1 Patienten und Kontrollgruppe

Die untersuchten Patienten stammten aus der Gastroenterologischen Ambulanz der Chirurgischen Universitätsklinik München/Klinikum Innenstadt (damaliger Leiter Prof. Dr. Dr. M. Gross), einer Spezialambulanz für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Es handelte sich um 86 Personen (61 Patienten mit M. Crohn und 25 Patienten mit Colitis ulcerosa) in einem Alter von 18 bis 82 Jahren. Die Studie wurde gemäß den Prinzipien der „Declaration of Helsinki“ durchgeführt [World Medical Association, 2002]. Die Patienten waren über Sinn und Zweck der Untersuchung ausführlich informiert und gaben ihr Einverständnis zu den molekularbiologischen Untersuchungen und Auswertung der Krankenakten. Um einen Vergleich zu einem Kontrollkollektiv zu haben, wurde jedem Patient ein gleichaltriger, gleichgeschlechtlicher Kontrollproband ohne CED zugeteilt. Die DNA-Proben dieser Personen, bei denen Untersuchungen zu Genmutationen des Myo-adenylatdesaminasegens erfolgten, wurden vom Purin-Labor (damaliger Leiter Prof. Dr. Dr. M. Gross) der Medizinischen Poliklinik München/Klinikum Innenstadt freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei den Kontrollprobanden gab es keine anamnestische oder körperliche Hinweise auf das Vorliegen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung. Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus mit dem Erkrankungsrisiko und Verlauf der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen. Zur Charakterisierung des klinischen Verlaufs der Erkrankungen dienten dabei mehrere Parameter (Alter bei Erstdiagnose und Geschlecht, Lokalisation und Ausdehnung der entzündlichen Schleimhautveränderungen, extraintestinale Manifestationen, Auftreten von Komplikationen, operative und immunsuppressive Therapie). Nach Erhebung der Parameter aus den Krankenakten wurden die experimentell ermittelten Genotyp- und Allelhäufigkeiten mit den klinischen Charakteristika der Patienten korreliert.

M. Crohn-Gruppe

Die Diagnose der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung basierte auf genau definierten klinischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Befunden [Adler, 1993].

Das Gesamtkollektiv bestand aus 61 (35 Frauen und 26 Männer) kaukasischen, nicht verwandten Patienten mit der Diagnose eines M. Crohn. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Datenerhebung war 39,6 Jahre (SD=14 Jahre), (Range: 18-82 Jahre) und das Alter bei Erstdiagnose 27,2 Jahre (SD=12,4 Jahre), (Range: 9-75 Jahre). Die klinischen Parameter für den Verlauf der Erkrankung waren:

1. Alter bei Erstdiagnose und Geschlecht

2. Ausdehnung und Lokalisation der Erkrankung

Den Patienten mit isoliertem Colonbefall wurden die Patienten mit einer Ileitis terminalis oder kombinierten Ileocolitis gegenübergestellt. Erkrankte mit einer Beteiligung des oberen Gastrointestinaltraktes (Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum) wurden dabei in der Gruppe mit Ileum/Ileocolonbefall miterfasst.

3. Extraintestinale Manifestationen

Patienten mit extraintestinalen Manifestationen der Gruppe A [Greenstein et al. 1976], wie Arthritiden, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Konjunktivitis und Iridozyklitis wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und mit Patienten ohne extraintestinale Manifestationen hinsichtlich der Genotyp- und Allelverteilung verglichen.

4. Intestinale Verlaufsform (Abszesse, Fisteln, Perforationen)

Patienten mit intestinalen Komplikationen wie anorektale Abszesse und Fisteln, Darmperforationen, entero-enterale Fisteln, oder enterokutane Fisteln, Fisteln zu anderen Organen wie Vagina, Harnblase oder Ureter, wurden als Patienten mit schwerem klinischem Verlauf definiert [Greenstein et al. 1988] und den Patienten ohne solche Komplikationen gegenübergestellt.

5. Operationen

Die Patienten mit mindestens einer erkrankungsbedingten Operation (Abszessoperation, Fisteloperation, Ileozökalresektion, Kolektomie) wurden zu einer Gruppe zusammengefasst.

6. Medikamentöse Therapien

Alle untersuchten Patienten standen unter einer remissionserhaltenden Therapie mit 5-Aminosalicylsäure-Präparaten (5-ASA), mit oder ohne Langzeit-Steroidmedikation. Erkrankte, die darüber hinaus eine immunsuppressive Behandlung mit Azathioprin, Methotrexat, 6-Mercaptopurin oder TNF- α -Antikörpern (Infliximab) benötigten, wurden gesondert hinsichtlich der Genotyp- und Allelverteilung betrachtet.

Colitis ulcerosa-Gruppe

Das Patientenkollektiv bestand aus 15 Männern und 10 Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 46,8 Jahren (SD=6,7 Jahre) (Range: 30-67 Jahre) bei Datenerhebung und einem mittleren Alter bei Erstdiagnose von 36,6 Jahren (SD=3,4 Jahre) (Range: 19-56 Jahre). Die Diagnosen waren aufgrund genau definierter, klinischer, radiologischer, endoskopischer und histologischer Befunde gesichert [Adler, 1993]. Die klinischen Verlaufsparemeter wurden ebenfalls aus den Krankenakten ermittelt:

1. Alter bei Erstdiagnose und Geschlecht

2. Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung

Die Patienten mit einer Pancolitis (Befall der gesamten Colon- und Rektumschleimhaut) wurden den Patienten, die an einem lokal begrenzten Befall des Colons (Proktitis, Rektosigmoiditis, Linksseitencolitis) erkrankt waren, gegenübergestellt.

3. Extraintestinale Manifestationen

Die Einteilung erfolgte analog zu der M. Crohn-Gruppe [Greenstein et al. 1976].

4. Komplikationen und Operationen

Typische Komplikationen bei den Colitis ulcerosa-Patienten waren das toxische Megakolon mit/ohne Perforation und schwere akute Hämorrhagien. In dieser Gruppe wurden Patienten mit Operationen (Proktokolektomien, Kolektomien) miterfasst und den Patienten ohne Operationen und/oder Komplikationen gegenübergestellt .

5. Medikamentöse Therapien

Die Patienten standen alle unter einer remissionserhaltenden Dauertherapie mit 5-ASA-Präparaten und zum Teil unter einer Glukokortikoid-Therapie. Patienten mit immunsuppressiver Behandlung (Azathioprin, Methotrexat) wurden gesondert hinsichtlich der Genotyp- und Allelverteilung untersucht.

2.1.2 Chemikalien

Zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen wurden folgende chemische Substanzen, Reaktions-Kits und Laborgeräte von folgenden Herstellern benützt:

DNA-Isolation:

100 % Ethanol	Krankenhausapotheke, Med. Poliklinik
20 % Natriumdodecylsulfat-Lösung	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: 05035
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: P 6556
Saccharose	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: S 7903
Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, 1 M	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: T 2319
Triton X-100-Lösung	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: T 9284
MgCl ₂ -Lösung 1 M	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: M 1028
Kristallines NaCl	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: S 7653
Kristallines EDTA-Na	Sigma (Deisenhofen), Art.Nr.: ED2P
Aqua destillata sterilis	Krankenhausapotheke Med. Poliklinik

Polymerase-Kettenreaktion:

PCR-Kit „HotStar-Taq Mix TM “	Quiagen (Hilden), Art.Nr.: 203445
PCR-Primer Pab 5', Pab 3'	Metabion (Martinsried, München)

Restriktionsanalyse:

Restriktionsenzym Pst I	Hybaid (Heidelberg), Art.Nr.: B00500M
Puffer „Apricot“	Hybaid (Heidelberg), Art.Nr.: B00500M

Elektrophorese:

5X „BlueRun-Puffer TM “	Hybaid (Heidelberg), Art.Nr.: DNA-BR-M
Qualex-Agarose Gold	Hybaid (Heidelberg), Art.Nr.: AGR-1000
0,5X Tris-Bor-EDTA-Lösung	Krankenhausapotheke, Med. Poliklinik
Gelstar TM	Biozym (Oldendorf), Art.Nr.: 850535
1 kbplus TM DNA-Marker	Life Technologies (USA), Art.Nr.: 10787-018

NaCl-EDTA-Lösung (0,075 M NaCl, 0,024 M EDTA):

Zur Herstellung der NaCl-EDTA-Lösung wurden mit der Mettler-Laborwaage 4,38 g kristallines NaCl und 8,93 g EDTA-Na abgewogen und destilliertes H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml zugegeben.

Lysis-Puffer (0,32 M Sacharose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100):

10 ml Tris-HCl-Puffer (1 M) wurden mit 5 ml MgCl₂-Lösung (1 M), 10 ml Triton-X und 109,54 g Sacharose gemischt. Anschließend wurde destilliertes Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml beigegeben.

Gesättigte NaCl-Lösung:

Zu 250ml destilliertem Wasser wurde kristallines NaCl zugegeben und gelöst bis sich am Boden des Gefäßes ein Bodensatz aus NaCl bildete, der sich nicht weiter solubilisieren ließ. Sämtliche fertige Lösungen wurden abschließend in einem Dampfautoklav sterilisiert.

2.1.3 Laborgeräte

Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Zentrifuge Sigma 3K20	Sigma Laborzentrifugen (Osterode)
Wasserbad GFL 1083	GFL (Burgwedel)
Mikrozentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Cycler Primus	Biorad, (USA)
Gelformen	Eigenbau
Horizontalgelkammern	MWG-Biotech (Ebersberg)
Transformator Power Pack 200	Biorad (München)
Transilluminator N90	Faust (Schaffhausen, Schweiz)
Digitalkamera EDH ^R kamPro 02	Kampro (Taiwan)
Mikrowelle	Sanyo (Japan)
Laborwaage AE 240	Mettler (Giessen)
Photometer UV-160	Shimadzu (Japan)
Autoklav KSG 110	Hettich Laborapparate, (Bäch, Schweiz)

2.1.4. Sonstige Materialien

EDTA-Monovetten	Sarstedt (Nürnberg)
Zentrifugenröhrchen steril, 50 ml	Greiner (Frickenhausen)
Filter-Pipettenspitzen (20 µl, 100µl, 1000 µl)	Biozym (Oldendorf)
Pipetten (20µl, 100µl, 1000 µl)	Gilson (USA)
Filter-Glaspipetten steril, 10 ml	Greiner (Frickenhausen)
Eppendorf-Tubes steril, 1,2 ml	Eppendorf (Eppendorf)
Laborflaschen, steril (1000 ml, 500 ml, 250 ml)	Schott (Mainz)
Microtubes steril, 200µl	Kisker (Steinfurt)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Die Isolation der Erbsubstanz erfolgt allgemein in Abhängigkeit von Gewebe- oder Zellart und der erforderlichen Qualität der zu isolierenden Nukleinsäure mit unterschiedlichen Verfahren. Erster Schritt ist die mechanische Lysis und Aufbrechung der Zellmembranen kombiniert mit chemischen Verfahren. In mehreren Schritten werden dann durch Reinigungsverfahren die Membrantrümmer und Zellorganellen entfernt. Eine Abtrennung der Proteine gelingt mit Phenol, Nachteil dieses Extraktionsverfahren ist jedoch die Toxizität des Phenols. Letzter Schritt der Nukleinsäureisolation ist eine Fällung der DNA mit reinem Alkohol, in Anwesenheit monovalenter Kationen. Als Untersuchungsmaterial standen sowohl bei den Morbus Crohn-Patienten, als auch bei der Colitis ulcerosa-Gruppe pro Person 3 ml EDTA-Vollblut zur Verfügung, das den Studienteilnehmern im Rahmen ihrer ambulanten Betreuung mit Hilfe des Sarstedt-Monovetten-Systems aus einer epifaszialen Armvene entnommen worden war. Vor der weiteren Verarbeitung lagerten die Blutproben bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, um so die Intaktheit der Nukleinsäuren zu gewährleisten. Die DNA-Isolation aus den peripheren Blutleukozyten erfolgte anschließend nach einem modifizierten Protokoll, bei dem keine Isolationsschritte mit Phenol notwendig sind [Gross und Rötzer, 1998]. Nach dem Auftauen der Proben bei Zimmertemperatur und kurzem vortexen der Monovetten, um etwaige noch vorhandene Zellkonglomerate zu lösen, die die weitere Isolation hätten stören können, wurden die Proben in einem sterilen 50 ml-Tube mit 15 ml Lysis-Puffer (0,32 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl_2 , 1 % Triton X-100) für 15 Sekunden vermischt. Die Zellsuspension wurde anschließend gekühlt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 10000 U/min in einer Sigma-Laborzentrifuge 3K20 zentrifugiert und der Überstand dann dekantiert, um das Pellet mit 4,5 ml NaCl-EDTA-Lösung (0,075 M NaCl, 0,024 M EDTA) durch 15 sekündiges vortexen wieder zu resuspendieren. Diese Schritte dienen der Lyse der Zellmembranen, ohne die eine Isolierung der Erbsubstanz nicht möglich ist. Nach erneutem Zentrifugieren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 10000 U/min wurde der Überstand mit den Zellmembrantrümmern verworfen und das Pellet, das jetzt im wesentlichen noch aus DNA, RNA und den an sie gebundenen Proteinen bestand, mit 4,5 ml NaCl-EDTA-Lösung (0,075 M NaCl, 0,024 M EDTA) durch kräftiges vortexen wieder gelöst.

Zu der Nukleinsäure-Protein-Lösung wurden anschließend 125 µl 20 % Natrium-Dodecylsulfat-Lösung pipettiert, kurz gevortext und danach noch 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen für 15 Sekunden inkubierte die Lösung für 15 Stunden bei 37 °C im Wasserbad. Die zugesetzte Proteinase K diente dem Abbau der an die DNA gebundenen Proteine. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Gemisch bei Zimmertemperatur wieder abgekühlt und nach Zugabe von 750 µl gesättigter NaCl-Lösung erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 7500 U/min in der Sigma-Zentrifuge 3K20, bei der die degradierten Proteine pelletierten. Der Überstand, der nun die Nukleinsäuren und noch Reste der Polypeptide enthielt, wurde in ein neues steriles 50 ml-Tube dekantiert, um den vorhergegangenen Zentrifugationsschritt noch einmal zu wiederholen, was die Reinheit der Nukleinsäurelösung erhöhte. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes in ein frisches 50 ml-Tube überschichtete man die Lösung vorsichtig mit 2,5 ml eiskaltem reinem Ethanol. Durch langsame, kreisende Bewegungen des Tubes kam es zu einer Präzipitation des „DNA-Fadens“, der nun mit einer Pipette in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Tube transferiert werden konnte. Das Tube wurde einmal bei 8000 U/min für 15 Min in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert, um danach den übrig gebliebenen Äthylalkoholüberstand problemlos verwerfen zu können. Zur Evaporisation von etwaigen Ethanolrückständen wurde das Tube für 48 Stunden zum Trocknen ausgelegt. Die getrocknete Nukleinsäure ließ sich abschließend mit 500 µl sterilem Wasser lösen. Eine Kontrolle der Reinheit und die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem Photometer bei 260 und 280 nm. Die isolierte Erbsubstanz lagerte anschließend bis zum Einsatz in der PCR bei -70 °C, um einer Degradation der Nukleinsäuren vorzubeugen.

Sämtliche Pipettierschritte wurden unter streng sterilen Kautelen mit sterilen Pipettenspitzen und Filterglaspipetten durchgeführt um eine Kontamination der Patienten-DNA mit Fremd-Nukleinsäure zu verhindern.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Mullis et al. 1986] wurde mit der sogenannten „Hotstart“-Technik gearbeitet, die spezifischere Ergebnisse liefert und die Ausbeute an der Zielsequenz erhöht [Chou et al. 1992]. Die Reaktionen werden hier erst bei hohen Temperaturen gestartet, wodurch ein unspezifisches Annealing (Primerbindung) verhindert wird, das vor allem bei niedrigen Temperaturen stattfindet.

Als PCR-System wurde der PCR-Kit „Hotstar™“ von Quiagen verwendet, der ein unkompliziertes Vorgehen bei einer „Hotstart“-PCR ermöglicht. Der Kit enthält den sogenannten „HotstarMix“ (2X konz.), der bis auf die Primer und das DNA-Template alle für eine PCR benötigten Chemikalien enthält (0,1 U/μl DNA-Polymerase, Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 3 mM MgCl₂ und 400 μM dNTP's). Eine Besonderheit dieses Kits ist die Polymerase, die bei niedrigen Temperaturen inaktiv ist. Die mit diesem System angesetzten Polymerase-Kettenreaktionen benötigen deshalb eine initiale Vorinkubation bei 95 °C für 15 Minuten, um die DNA-Polymerase zu aktivieren.

Die DNA-Sequenz, die in der PCR vervielfältigt wurde, hat eine Länge von 1117 Basenpaaren und befindet sich im Gen für das induzierbare Hitzeschockprotein Hsp72 (Hsp70-2) im MHC-Komplex auf Chromosom 6 zwischen den Nukleotiden 1084-2200 [Milner und Campbell, 1990] (Abb. 2.1). Als Primer wurden die folgenden Oligonukleotide in die Reaktion eingesetzt [Pablos et al. 1995]:

Forward Primer	Pab 5'	5'-CAT CGA CTT CTA CAC GTC CA-3'
Tm	57,3 °C	MW 5997
Reversed Primer	Pab 3'	5'-CAA AGT CCT TGA GTC CCA AC-3'
Tm	57,3 °C	MW 6046

(Tm= Schmelztemperatur, MW= Molekulargewicht)

BASE COUNT	640 a	798 c	879 g	559 t		
ORIGIN	Chromosome 6p21					
-271	tgccatgaga	ccaacaccct	tcccaccacc	actccccctt	ctctcagggc	cctgtcccc
-211	tccagtgaat	cccagaagac	tctggagagt	tctgagcaga	gggcggcacc	ctgccctctg
-151	attggtccaa	ggaaggctgg	ggggcaggac	gggaggcgaa	acccctggaa	tattcccgcac
-91	ctggcagcct	catcgagctt	ggtgattggc	tcagaagggg	aaaggcgggt	ctccacgacg
-31	acttataaaa	gccgaggggc	gcgcggtccg	gaaaacggcc	agcctgagga	gctgctgcga
30	gggtccgctt	cgtctttcga	gagtgactcc	cgcggtccca	aggctttcca	gagcgaacct
90	gtgcggctgc	aggcaccggc	gtggtgagtt	tccggcggtc	cgaaggactg	agctcttgct
150	gcggatcccc	tccgccgttt	ccagccccc	gtctcagagc	ggagcccaca	gagcagggca
210	ccggcatggc	caaagccgcg	gcgatcggca	tcgacctggg	caccacctac	tcctgcgctg
270	gggtgttcca	acacggcaag	gtggagatca	tcgccaacga	ccagggcaac	cgcaccaccc
330	ccagctacgt	ggccttcacg	gacaccgagc	ggctcatcgg	ggatgcggcc	aagaaccagg
390	tggcgctgaa	ccgcgagaac	accgtgtttg	acgcgaagcg	cctgatcggc	cgcaagtctg
450	gcgaccgggt	ggtgcagtcg	gacatgaagc	actggccttt	ccaggtgatc	aacgacggag
510	acaagcccaa	ggtgcagggt	agctacaagg	gggagacc	ggcattctac	cccaggagga
570	tctcgtccat	ggtgctgacc	aagatgaagg	agatcgccga	ggcgtacctg	ggctaccggg
630	tgaccaacgc	ggtgatcacc	gtgccggcct	acttcaacga	ctcgcagcgc	caggccacca
690	aggatgcggg	tgtgatcgcg	gggtcacaag	tgctgcggat	catcaacgag	cccacggccg
750	ccgccatcgc	ctacggcctg	gacagaacgg	gcaaggggga	gcgcaacgtc	ctgatctttg
810	acctggggcg	gggcaccttc	gacgtgtcca	tcctgacgat	cgacgacggc	atcttcgagg
870	tgaaggccac	ggccggggac	acccacctgg	gtggggagga	ctttgacaac	aggctggtga
930	accacttcgt	ggaggagtcc	aagagaaaac	acaagaagga	catcagccag	aacaagcgag
990	ccgtgaggcg	gctgcgccac	gcctgcgaga	gggccaagag	gaccctgtcg	tccagcacc
Pab' 5						
1050	agggcagcct	ggagatcgac	tcctgttttg	agggcatcga	cttctacacg	tccatcacca
1110	gggcgaggtt	cgaggagctg	tgctccgacc	tggtccgaag	caccctggag	cccgtaggag
1170	aggctctgcg	cgacgccaa	ctggacaagg	cccagattca	cgacctgggc	ctggtagggg
PstI-Site						
1230	gctccaccgc	catccccaag	gtgcagaagc	tgctgca ^{gga}	cttcttcaac	gggcgcgacc
1290	tgaacaagag	catcaacccc	gacgaggctg	tggtctacgg	ggcggcgggtg	caggcgggcca
1350	tcctgatggg	ggacaagtcc	gagaacgtgc	aggacctgct	gctgctggac	gtggctcccc
1410	tgctcgctggg	gctggagacg	gccggaggcg	tgatgactgc	cctgatcaag	cgcaactcca
1470	ccatccccc	caagcagacg	cagatcttca	ccacctactc	cgacaaccaa	cccgggggtgc
1530	tgatccaggt	gtacgagggc	gagagggcca	tgacgaaaga	caacaatctg	ttggggcgct
1590	tcgagctgag	cggcattcct	ccggccccc	ggggcggtgc	ccagatcgag	gtgaccttcg
1650	acatcgatgc	caacggcatc	ctgaacgtca	cgccacacga	caagagcacc	ggcaaggcca
1710	acaagatcac	catcaccaac	gacaagggcc	gcctgagcaa	ggaggagatc	gagcgcattg
1770	tgcaggaggc	ggagaagtac	aaagcggagg	acgagggtgc	gcgcgagagg	gtgtcagcca
1830	agaacgccct	ggagtccctc	gccttcaaca	tgaagagcgc	cgtggaggat	gaggggctca
1890	agggcaagat	cagcgaggcc	gacaagaaga	aggttctgga	caagtgtcaa	gaggtcatct
1950	cgtggctgga	cgccaacacc	ttggccgaga	aggacgagtt	tgagcacaag	aggaaggagc
2010	tggagcaggt	gtgtaacccc	atcatcagcg	gactgtacca	gggtgccggg	ggtcccgggc
2070	ctggcggtct	cggggctcag	ggtcccaagg	gagggctctg	gtcaggccct	accattgagg
Pab' 3'						
2130	aggtggatta	ggggcctttg	ttcttttagta	tggttgtctt	tgaggtggac	tggtgggact
2190	caaggacttt	gctgctgttt	tcctatgtca	tttctgcttc	agctctttgc	tgcttcactt
2250	ctttgtaaag	ttgtaacctg	atggtaatta	gctggcttca	ttatttttgt	agtacaaccg
2310	atatgttcat	tagaattctt	tgcatttaat	gttgatactg	taagggtgtt	tcgttccctt
2370	taaatgaatc	aacactgcca	ccttctgtac	gagtttgttt	gttttttttt	tttttttttt
2430	tttttgcttg	gcgaaaacac	tacaaaggct	gggaatgtat	gtttttataa	tttgtttatt
2490	taaatatgaa	aaataaaatg	ttaaactttt	tcttgtctgt	taatatgtga	agataatgga
2550	tatttgcgga	gggatagtgt	ctgaatacca	tctatcttta	tagtctgaaa	agaaca

Abb. 2.1 HSP70-2 Gensequenz [Milner und Campbell, 1990]

Allel B: Die Lokalisation des Transitionspolymorphismus ist **fett/kursiv** dargestellt

Für den Reaktionsansatz wurde folgendes Protokoll benutzt:

HotStar Mix™ 2X	10	µl
Forward Primer Pab 5` (12 µM)	0,5	µl
Reversed Primer Pab 3` (12 µM)	0,5	µl
H ₂ O steril	7	µl
DNA-Template (200 ng/µl)	2	µl
	20	µl gesamt

Vorteil, aber auch gleichzeitig Nachteil der Polymerase-Kettenreaktion ist ihre hohe Sensitivität, d.h. auch geringe Mengen an Ausgangs-DNA liefern nach der Reaktion ein detektierbares Signal. Dadurch erhöht sich jedoch das Risiko einer Verfälschung durch mit Fremd-Nukleinsäuren kontaminierte Chemikalien. Um eine solche „Verschmutzung“ der Reagenzien erkennen zu können, wurde bei jeder Serie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die keine Patienten-DNA enthielt:

HotStar Mix™ 2X	10	µl
Forward Primer Pab 5` (12 µM)	0,5	µl
Reversed Primer Pab 3` (12 µM)	0,5	µl
H ₂ O steril	9	µl
	20	µl gesamt

Die Chemikalien und das DNA-Template wurden auf Eis aufgetaut und nach dem Auftauen kurz gevortext, um homogene Lösungsverhältnisse zu schaffen. Danach wurde der „HotstarMix“, die Primer und anschließend jeweils die Patienten-DNA in ein steriles 200 µl-Micro-Tube pipettiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Als PCR-Bedingungen wurde in Anlehnung an eine Publikation [Esaki et al. 1998] ein in Temperaturen und Inkubationszeiten modifiziertes Protokoll mit 30 Amplifikationszyklen benutzt:

95 °C	15 min	Vorinkubation	
94 °C	30 sec	Denaturierung	
54 °C	20 sec	Annealing	30 Zyklen
72 °C	1,5 min	Elongation	
72 °C	2 min	Abschließende Elongation	

Nach Ende der Kettenreaktion lagerten die Micro-Tubes bis zum nächsten experimentellen Schritt bei –70 °C.

2.2.3 RFLP-Analyse

In dieser Arbeit wurde mit dem Restriktionsenzym PstI gearbeitet, das erstmals 1976 aus *Providencia stuarti* isoliert wurde [Smith et al. 1976]. Das Enzym erkennt die Sequenz 5'-CTGCAG-3' und schneidet den DNA-Strang zwischen dem Guanin und Adeninrest am 3'-Ende der Erkennungssequenz [Smith et al. 1976]. Innerhalb des in der PCR vervielfältigten Abschnitts des HSP70-2 Gens befindet sich im codierenden Bereich im Nukleotid 1267 ein Single-Nucleotid-Polymorphismus (PstI-Polymorphismus), bei dem das Adenin durch einen Guaninrest ersetzt ist [Milner und Campbell, 1990] (Abb. 2.1). Bei Vorliegen dieser Transition wird hier vom **Allel B** gesprochen, ansonsten vom **Allel A**. Bei Allel B erkennt das Restriktionsenzym PstI seine Schnittsequenz von Nukleotid 1262-1267 und schneidet das 1117 bp-Fragment in ein kurzes 181 bp-Fragment und ein langes 936 bp-Fragment. Bei Homozygotie für das Allel A (Genotyp **AA**) erkennt man in der Gelelektrophorese nur eine Bande bei 1117 bp, bei Heterozgotie (Genotyp **AB**) sieht man drei Banden bei 1117 bp, 936 bp und 181 bp. Ist der Patient homozygot für die Transition (Genotyp **BB**) lassen sich zwei Banden bei 936 bp und 181 bp detektieren (Abb. 2.3). Das Restriktionsenzym lieferte die Firma Hybaid zusammen mit dem nötigen Puffersystem (Puffer ApricotTM). Das Enzym hat eine Konzentration von 10 U/μl und ist in 200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (ph 7.4), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 0,15 % Triton X-100 und 50 % Glycerol gelöst. Der Puffer „Apricot“ (10X konz.) enthält 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl, 1000 μg/ml BSA (ph 7,5).

Die Restriktionsanalyse wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Restrikt.-Enzym Pst I 10 U/μl	2 μl
Puffer "Apricot" 10X	2 μl
H ₂ O steril	14 μl
PCR-Produkt	2 μl
20 μl gesamt	

Um eine Kontamination der Ansätze mit Fremd-DNA erkennen zu können, wurde wieder bei jeder Versuchsreihe eine Leerprobe ohne PCR-Template mitgeführt.

Restrikt.-Enzym Pst I 10 U/ μ l	2 μ l
Puffer „Apricot“ 10X	2 μ l
H ₂ O steril	16 μ l
20 μ l gesamt	

Die Enzymlösung, der Puffer „Apricot“ und das jeweilige PCR-Amplifikat (bzw. einmal nur Wasser als Negativkontrolle) wurden auf Eis in ein steriles 200 μ l Micro-Tube pipettiert, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt und anschließend im PCR-Cycler bei 37 °C eine Stunde lang inkubiert. Um eine Verdunstung der Probenflüssigkeit zu verhindern und damit einer Verfälschung der Konzentrationen vorzubeugen, wurde der Deckel des Cycler mit 70 °C beheizt. Nach Ende der Inkubation wurden die Micro-Tubes vor der Elektrophorese bei –70 °C verwahrt.

2.2.4 Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2 g Qualex-Agarose mit 100 ml 0,5 % Tris-Bor-EDTA-Laufpuffer (Tris 44,5 mM/, Borsäure 44,5 mM, EDTA-2 Na-2H₂O 1 mM) in einer Duran Labor-Flasche vermischt und anschließend in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Anschließend wurde das Gel bei Zimmertemperatur auf 60 °C abgekühlt, 2 µl 10000x konz. GelStar™ hinzugefügt und durch langsames Kreisen der Flasche mit dem Gel vermischt. Danach konnte das noch flüssige Gel in einen Gelträger mit eingelassenem Kamm gegossen und zur weiteren Abkühlung in den Kühlschrank gestellt werden. Um die erfolgreiche Amplifikation des Genfragments vor der Restriktionsanalyse zu kontrollieren, wurden in die 20 µl-Kammern des Gels jeweils 2 µl des PCR-Produkts + 2µl 1X BlueRun-Ladepuffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,0, 30 mM EDTA, 5 % Glycerol, 0,01 % Bromophenolblau) pipettiert. Um ein „Überlaufen“ zu vermeiden wurde jeweils eine Spur ausgespart. Als Längenstandard wurde in den letzten Slot des Gels 15 µl der 1 kb-Leiter™ von LifeTechnologies (20 ng/µl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl und 1 mM EDTA, 0,5 X BlueRun-Ladepuffer) pipettiert. Nachdem das Gel in die mit 0,5 % TBE-Lösung gefüllte Elektrophoresekammer verbracht war, wurde an die Kammer eine Spannung von 8 V/cm angelegt. Nach einer Laufzeit von 70 min wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel auf den Transilluminator verbracht und dort die aufgetrennten DNA-Banden mittels UV-Licht (300 nm) sichtbar gemacht (Abb. 2.2).

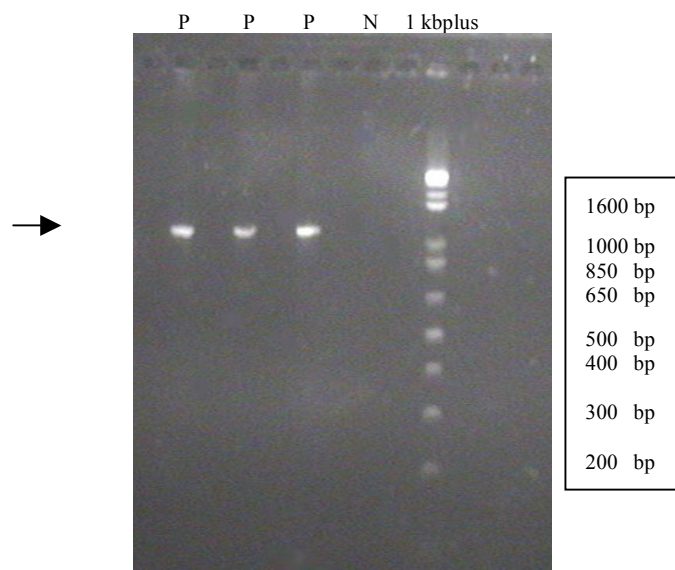


Abb. 2.2 PCR-Elektrophorese (→ =1117 bp)

Abk.: P= PCR-Amplifikat, N= Negativkontrolle, zum Erkennen von Kontaminationen

Nach der Restriktion wurden nun 18 µl des Restriktionsansatzes + 2 µl 5X-BlueRun-Ladepuffer (25 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM EDTA, 25 % Glycerol, 0,05 % Bromophenolblau) in die Gelslots gefüllt. Neben dem Restriktionsansatz wurden noch einmal 2 µl des jeweiligen PCR-Amplifikats + 2 µl 1x BlueRun-Ladepuffer aufgetragen, um den Unterschied zwischen verdauter und unverdauter DNA vergleichen zu können. Zum Schutz gegen Überlaufen wurde wieder jeweils eine Spur ausgespart. In die letzte Gelkammer des Gels wurde als Längenstandard 15 µl des DNA-Markers pipettiert. Die Elektrophorese wurde dann in 0,5 % TBE-Laufpuffer mit einer Laufspannung von 8 V/cm für 70 Minuten durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte wie schon bei der PCR-Elektrophorese (Abb. 2.3).

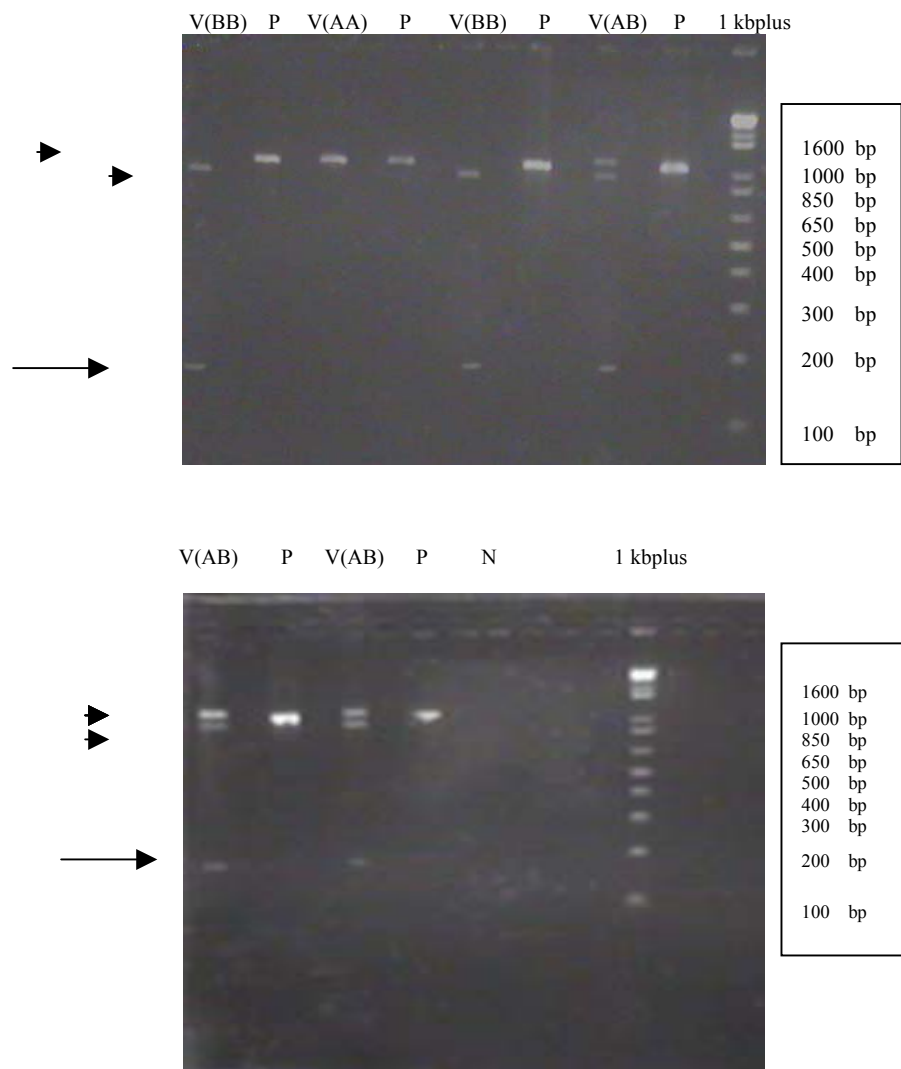


Abb. 2.3 RFLP-Elektrophorese (➤= 1117 bp-Fragment und 936 bp-Fragment, →=181 bp-Fragment)

Abk.: V(Genotyp)= Restriktion, P= PCR-Amplifikat, N= Negativ-Kontrolle

2.2.5 Dokumentation

Die Agarosegele wurden mithilfe einer Digitalkamera fotografiert und anschließend mit dem Bildverarbeitungsprogramm „AdobeActive Share“ auf einem PC archiviert.

2.2.6 Statistik

Verwendete statistische Tests waren der χ^2 -Test für Vierfeldertafeln und χ^2 -Test für RXC-Tafeln. Bei absoluten Häufigkeiten <5 wurde Fishers exakter Test benutzt [Weiß, 2002]. Die Altersverteilungen konnten mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede getestet werden. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet (*= signifikant). Die OddsRatios (OR) im Ergebnisteil sind für das Allel B angegeben und sind jeweils nach folgendem Schema berechnet (Abb. 2.4). Zur Berechnung der Tests dienten Microsoft ExcelTM für χ^2 -Test für Vierfeldertafeln und χ^2 -Test für RXC-Tafeln, sowie Online-Statistikprogramme (www.home.clara.net/sisa/fiveby2.html für Fishers exakten Test und www.physics.csbsju.edu/stats/anova_NGROUP_NMAX_form.html für die einfaktorielle Varianzanalyse).

	Ja	Nein
Allel A	a = 43	b = 25
Allel B	c = 41	d = 13

OddsRatio (OR): $c \times b / d \times a = 41 \times 25 / 13 \times 43 = 1,8$

Abb. 2.4: Berechnung der OddsRatio

Am Beispiel von Operationen bei Morbus Crohn-Patienten.

3 Ergebnisse

3.1 Morbus Crohn-Patienten

3.1.1 Genotyp- und Allelverteilung

Häufigster Genotyp bei Patienten und Kontrollkollektiv war AB (52 % vs. 51 %). Genotyp- und Allelverteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander (Tab. 3.1 und Abb. 3.1a). Allel B kam in der Patientengruppe nicht signifikant häufiger vor als im Kontrollkollektiv (44 % vs. 42 %) (Tab. 3.2 und Abb. 3.1b).

Tab. 3.1 Genotypverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen (%)

	Patienten (n=61)	Kontrollpersonen (n=61)
AA	18 (30)	20 (33)
AB	32 (52)	31 (51)
BB	11 (18)	10 (16)

p=0.9

Tab. 3.2 Allelverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen (%)

	Patienten	Kontrollpersonen
A	68 (56)	71 (58)
B	54 (44)	51 (42)

OR=1.1 [95 % CI: 0.67-1.84] p=0.7

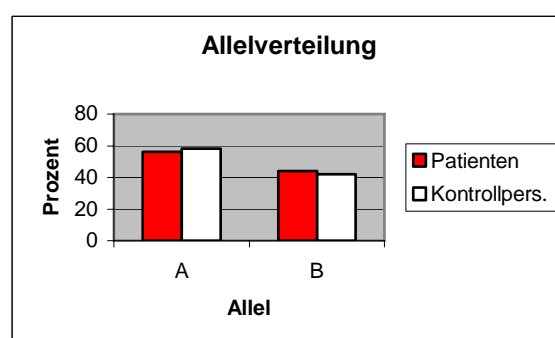
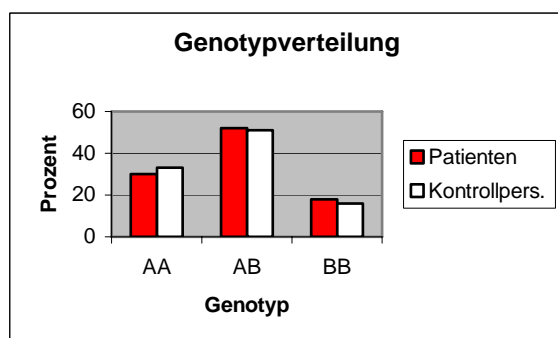


Abb. 3.1a/b Genotyp/Allelverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen

3.1.2 Alter und Erstdiagnose

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Durchschnitt 39,6 Jahre (SD=14 Jahre) alt (Range: 18-82 Jahre) und die Erstdiagnose der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung wurde bei ihnen im Mittel mit 27,2 Jahren (SD=12,4 Jahre) gestellt (Range 9-75 Jahre). Das jüngste Durchschnittsalter bei Erstdiagnose hatten Patienten mit Genotyp AB (25 Jahre). Die Mittelwerte in den einzelnen Genotypklassen (AA, AB, BB) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab 3.3).

Tab. 3.3 Alter und Erstdiagnose (SD)

	Alter (SD)	Alter b. Erstdiagnose (SD)
AA	41,8 (17,2)	31,1 (16,6)
AB	38,2 (12,0)	25,0 (9,50)
BB	39,6 (14,5)	27,3 (11,5)

p=0.7

p=0.3

3.1.3 Geschlechterverteilung

Im untersuchten Patientenkollektiv überwogen die Frauen (57 %) leicht gegenüber den Männern (43 %). Genotyp BB und Allel B kamen etwas häufiger bei Männern vor (23 % vs. 14 %, resp. 46 % vs. 43 %), zwischen den Geschlechtern ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zeigen (Tab. 3.4/3.5 und Abb. 3.2a+b).

Tab. 3.4 Genotypverteilung bei Männern und Frauen (%)

	Männer (n=26)	Frauen (n=35)
AA	08 (31)	10 (29)
AB	12 (46)	20 (57)
BB	06 (23)	05 (14)

p=0.6

Tab. 3.5 Allelverteilung bei Männern und Frauen (%)

	Männer	Frauen
A	28 (54)	40 (57)
B	24 (46)	30 (43)

OR= 1.14 [95% CI: 0.56-2.35] p=0.72

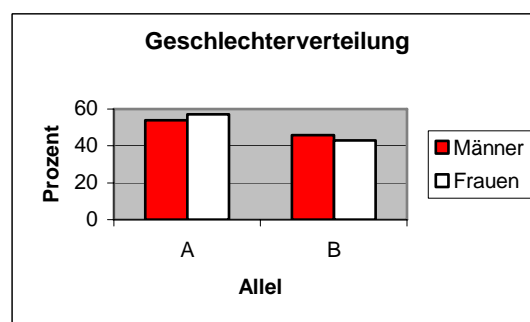
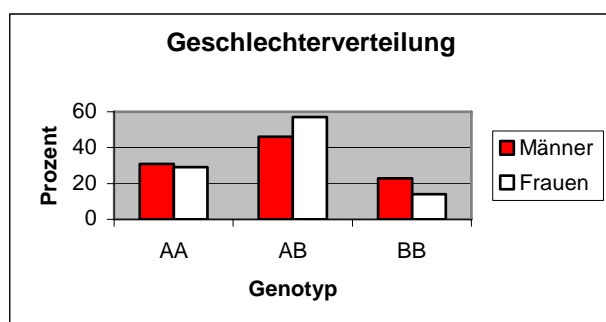


Abb. 3.2a/b Genotyp/Allelverteilung bei Männern und Frauen

3.1.4 Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung

12 Patienten (20 %) hatten eine isolierte Colitis, während die Mehrzahl der Patienten (n=49, 80 %) eine Ileitis oder kombinierte Ileocolitis hatten. Bei Patienten mit isolierter Colitis war der Genotyp BB häufiger zu finden (42 % vs. 12 %). Die Genotypverteilungen in beiden Gruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant (Tab. 3.6 und Abb. 3.3a). Das Allel B war signifikant häufiger in der Gruppe mit Colitis zu finden (62 % vs. 40 %) (Tab. 3.7 und Abb. 3.3b).

Tab. 3.6 Genotypverteilung bei verschiedenen Ausdehnungen (%)

	Ileocolitis/Ileitis (n=49)	Colitis (n=12)
AA	16 (33)	02 (16)
AB	27 (55)	05 (42)
BB	06 (12)	05 (42)

p=0.08

Tab. 3.7 Allelverteilung bei verschiedenen Ausdehnungen (%)

	Ileocolitis/Ileitis	Colitis
A	59 (60)	09 (38)
B	39 (40)	15 (62)

OR=0.4 [95 % CI: 0.16-0.99] p=0.04 *

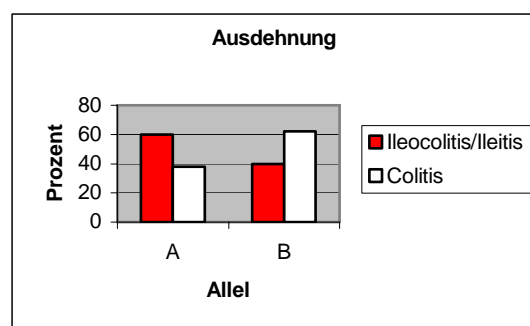
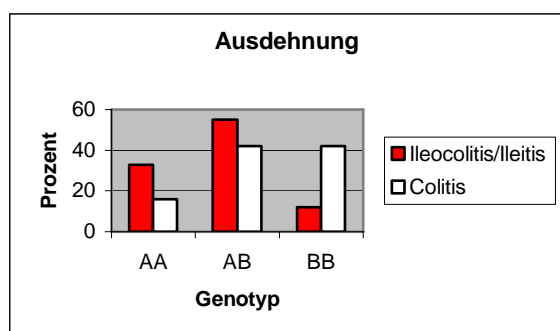


Abb. 3.3.a/b Genotyp/Allelverteilung bei verschiedenen Ausdehnungen

3.1.5 Extraintestinale Manifestationen

27 Patienten (44 %) hatten extraintestinale Manifestationen (EIM) eines Morbus Crohn. Zwischen den Patienten mit und ohne extraintestinale Manifestationen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Genotypverteilung festgestellt werden (Tab. 3.8 und Abb. 3.4a). Die Allelverteilungen unterschieden sich nicht in den beiden Subgruppen (Tab. 3.9 und Abb. 3.4b).

Tab. 3.8 Genotypverteilung bei Pat. mit/ohne EIM (%)

	Ja (n=27)	Nein (n=34)
AA	07 (26)	11 (32)
AB	16 (59)	16 (47)
BB	04 (15)	07 (21)

p=0.6

Tab. 3.9 Allelverteilung bei Pat. mit/ohne EIM (%)

	Ja	Nein
A	30 (56)	38 (56)
B	24 (44)	30 (44)

OR=1.0 [95 % CI: 0.49-2.08] p=0.95

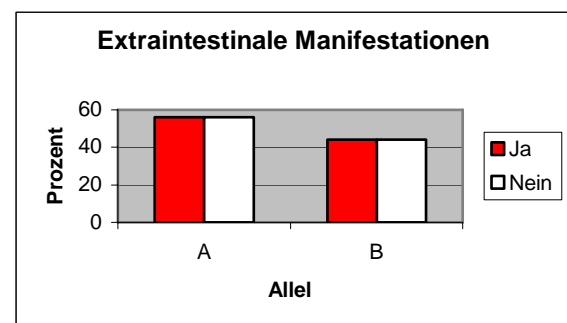
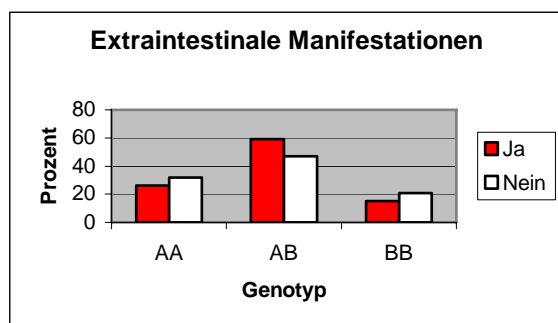


Abb. 3.4a/b Genotyp-/Allelverteilung bei Pat. mit/ohne EIM

3.1.6 Intestinale Verlaufsformen

22 Patienten (36 %) hatten einen sogenannten milden Krankheitsverlauf (NP= nicht-perforierend), während 39 Patienten an einem aggressiven intestinalen Verlauf der Erkrankung (P= perforierend) mit Bildung von Perforationen, Fisteln und Abszessen litten. In der Gruppe mit einem milden Verlauf (NP) hatten die Patienten mit Genotyp BB nur einen Anteil von fünf Prozent, wohingegen Patienten mit Genotyp AA 41 % der Patienten ausmachten. Der Anteil der Patienten mit Genotyp BB in der Gruppe mit aggressivem Verlauf war demgegenüber deutlich höher (26 % vs. 5 %) (Tab. 3.10 und Abb. 3.5a). Die Unterschiede in den Genotypverteilungen waren zwar nicht signifikant, jedoch kam das Allel B in der Gruppe mit einem schweren intestinalen Verlauf (P) der Erkrankung signifikant häufiger vor (51 % vs. 32 %) (Tab. 3.11 und Abb. 3.5b).

Tab. 3.10 Genotypverteilung bei verschiedenen intest. Verlaufsformen (%)

	P (n=39)	NP (n=22)
AA	09 (23)	09 (41)
AB	20 (51)	12 (54)
BB	10 (26)	01 (05)

p=0.07

Tab. 3.11 Allelverteilung bei verschiedenen intest. Verlaufsformen (%)

	P	NP
A	38 (49)	30 (68)
B	40 (51)	14 (32)

OR=2.3 [95 % CI: 1.04-4.89] p=0.04 *

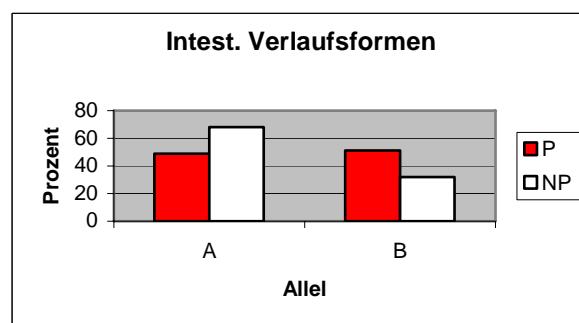
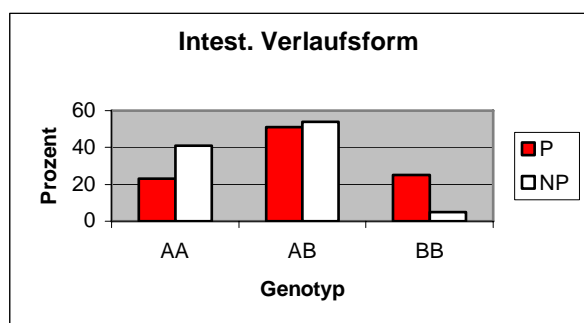


Abb. 3.5a/b Genotyp/Allelverteilung bei versch. intestinalen Verlaufsformen

3.1.7 Operationen

Von 61 Patienten mussten sich 19 (31 %) keiner erkrankungsbedingten Operation unterziehen, wohingegen 42 Patienten mindestens einmal im Verlauf ihrer Erkrankung operiert wurden. Bei operierten Patienten kam der Genotyp BB nicht signifikant häufiger vor als bei den anderen Patienten (21 % vs. 11 %) (Tab. 3.12 und Abb. 3.6a). Das Allel B kam häufiger bei operierten Patienten vor (49 % vs. 34 %), eine Signifikanz konnte jedoch nicht gezeigt werden (Tab. 3.13 und Abb. 3.6b).

Tab. 3.12 Genotypverteilung bei Pat. mit/ohne Operationen (%)

	Ja (n=42)	Nein (n=19)
AA	10 (24)	08 (42)
AB	23 (55)	09 (47)
BB	09 (21)	02 (11)

p=0.3

Tab. 3.13 Allelverteilung bei Pat mit/ohne Operationen (%)

	Ja	Nein
A	43 (51)	25 (66)
B	41 (49)	13 (34)

OR=1.8 [95 % CI: 0.83-4.06] p=0.13

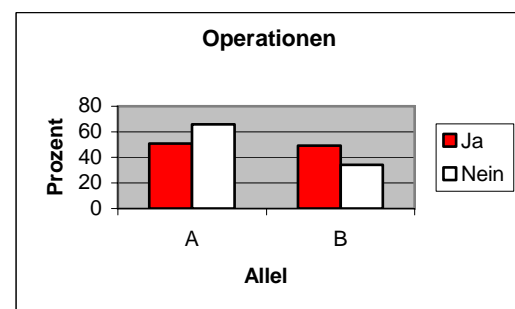
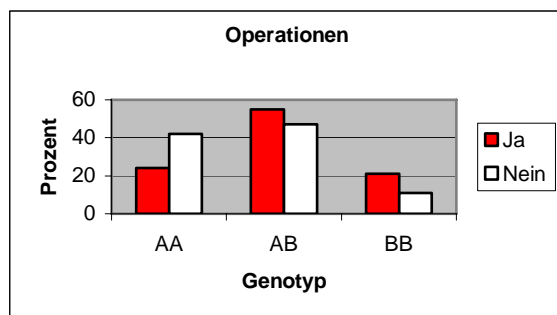


Abb. 3.6a/b Genotyp/Allelverteilung bei Pat. mit/ohne Operationen

3.1.8 Immunsuppressiva

24 Patienten (39 %) mussten mit immunsuppressiven Medikamenten (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, TNF- α -Antikörpern) behandelt werden. Signifikante Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zu den Patienten unter gewöhnlicher 5-ASA/Glukokortikoid-Therapie konnten nicht festgestellt werden (Tab. 3.14/3.15 und Abb. 3.7a+b).

Tab. 3.14 Genotypverteilung bei Pat. mit/ohne Immunsuppressiva (%)

	Ja (n=24)	Nein (n=37)
AA	08 (33)	10 (27)
AB	12 (50)	20 (54)
BB	04 (17)	07 (19)

p=0.9

Tab. 3.15 Allelverteilung bei Pat. mit/ohne Immunsuppressiva (%)

	Ja	Nein
A	28 (58)	40 (54)
B	20 (42)	34 (46)

OR=0.8 [95 % CI: 0.40-1.75] p=0.64

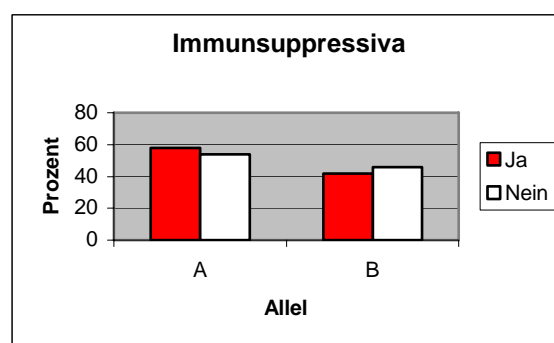
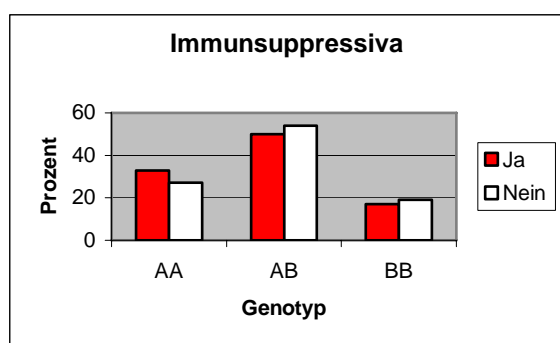


Abb. 3.7a/b Genotyp-/Allelverteilung bei Pat. mit/ohne Immunsuppressiva

3.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

1.

Das Allel B kam bei Patienten mit Morbus Crohn nicht signifikant häufiger vor als bei gesunden Kontrollpersonen (44 % vs. 42 %)

2.

Patienten mit Genotyp AB hatten das jüngste Durchschnittsalter bei Erstdiagnose (25 Jahre). Die Unterschiede zu den anderen Genotypen waren nicht signifikant.

3.

Das Allel B kam nicht signifikant häufiger bei Männern als bei Frauen vor (46 % vs. 43 %).

4.

Bei Patienten mit isolierter Colitis kam das Allel B signifikant ($p=0,04$) häufiger vor als bei Patienten mit Ileocolitis oder Ileitis (62 % vs. 40 %).

5.

Das Allel B kam bei Patienten mit extraintestinalen Manifestationen nicht häufiger vor als bei Patienten ohne extraintestinale Manifestationen (44 % vs. 44 %).

6.

Das Allel B kam signifikant ($p=0,04$) häufiger bei Patienten mit einem schweren Verlauf des M. Crohn vor als bei Patienten mit einem milden Verlauf (51 % vs. 32 %). Das Allel B war mit einer nicht signifikant erhöhten Operationshäufigkeit assoziiert (49 % vs. 34 %).

7.

Bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie kam das Allel B nicht signifikant seltener vor als bei Patienten unter gewöhnlicher Glukokortikoid/5-ASA Therapie (42 % vs. 46 %).

3.2 Colitis ulcerosa-Patienten

3.2.1 Genotyp und Allelverteilung

Auch bei den Colitis ulcerosa-Patienten und Kontrollkollektiv war der häufigste Genotyp AB (44 % vs. 40 %). Genotypverteilung und Allelfrequenzen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander (Tab. 3.16/3.17 und Abb. 3.8a + b).

Tab. 3.16 Genotypverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen (%)

	Patienten(n=25)	Kontrollpersonen(n=25)
AA	09 (36)	09 (36)
AB	11 (44)	10 (40)
BB	05 (20)	06 (24)

p=0.93

Tab. 3.17 Allelverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen (%)

	Patienten (%)	Kontrollpersonen (%)
A	29 (58)	28 (56)
B	21 (42)	22 (44)

OR=0.9 [95 % CI: 0.42-2.03] p=0.84

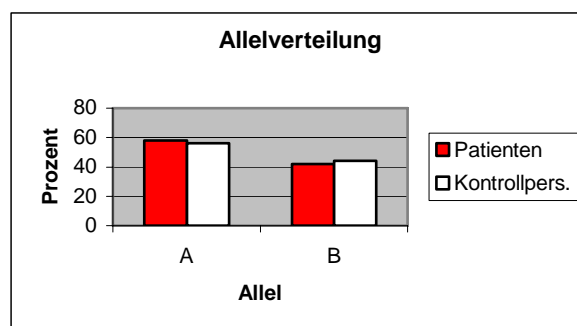
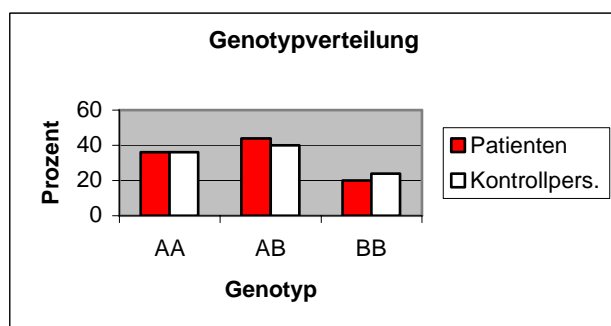


Abb. 3.8a/b Genotyp-/Allelverteilung bei Patienten und Kontrollpersonen

3.2.2 Alter und Erstdiagnose

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Durchschnitt 46,8 Jahre (SD=6,7 Jahre) alt (Range: 30-67 Jahre) und die Erstdiagnose der Colitis ulcerosa wurde bei ihnen im Mittel mit 36,6 Jahren (SD=3,4 Jahre) gestellt (Range: 19-56 Jahre). Die Mittelwerte in den einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab. 3.18).

Tab. 3.18 Alter und Alter bei Erstdiagnose (SD)

	Alter (SD)	Alter bei Erstdiagnose (SD)
AA	48,9 (13,9)	37,2 (12,3)
AB	48,4 (09,5)	39,2 (11,7)
BB	39,8 (08,4)	29,8 (06,9)

p=0.30

p=0.32

3.2.3 Geschlechterverteilung

Im untersuchten Patientenkollektiv überwogen die Männer (60 %) gegenüber den Frauen (40 %). Zwischen den Geschlechtern gab es keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung (Tab. 3.19/3.20 und Abb. 3.9a + b)

Tab. 3.19 Genotypverteilung bei Männern und Frauen (%)

	Männer (n=15)	Frauen (n=10)
AA	5 (33)	4 (40)
AB	7 (47)	4 (40)
BB	3 (20)	2 (20)

$p \approx 1.0$

Tab. 3.20 Allelverteilung bei Männern und Frauen (%)

	Männer	Frauen
A	17 (57)	12 (60)
B	13 (43)	08 (40)

OR=1.15 [95 % CI: 0.36-3.62] $p=0.82$

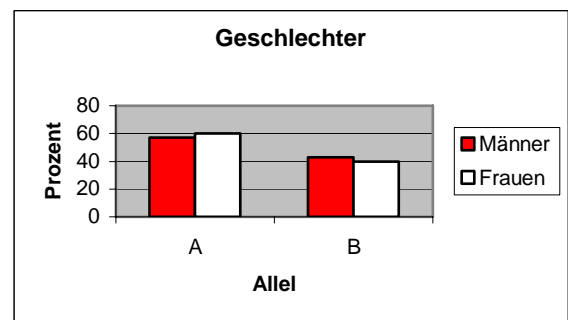
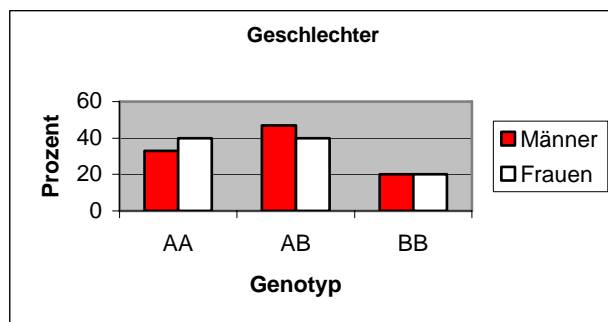


Abb. 3.9a/b Genotyp/Allelverteilung bei Männern und Frauen

3.2.4 Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung

Acht Patienten (32 %) hatten eine Pancolitis während 17 Patienten (68 %) nur eine lokal begrenzte Colitis (Teilcolitis) hatten. Die Unterschiede in den Genotypverteilungen zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (Tab. 3.21 und Abb. 3.10a). Bei Patienten mit Pancolitis hatte das Allel B einen höheren Anteil als in der Gruppe mit lokal begrenzter Colitis (Tab. 3.22 und Abb. 3.10b), der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Tab. 3.21 Genotypverteilung bei verschiedenen Ausdehnungen (%)

	Pancolitis (n=8)	Teilcolitis (n=17)
AA	02 (25)	07 (41)
AB	04 (50)	07 (41)
BB	02 (25)	03 (18)

p=0.7

Tab. 3.22 Allelverteilung bei verschiedenen Ausdehnungen (%)

	Pancolitis	Teilcolitis
A	08 (50)	21 (62)
B	08 (50)	13 (38)

OR=1.6 [95 % CI: 0.49-5.36] p=0.43

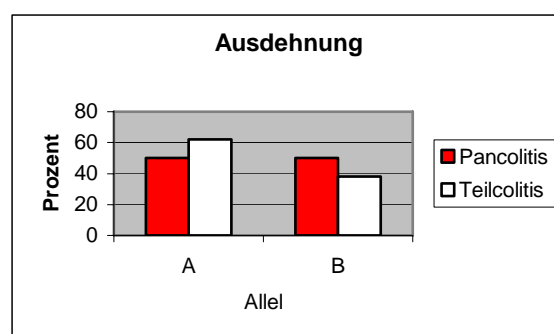
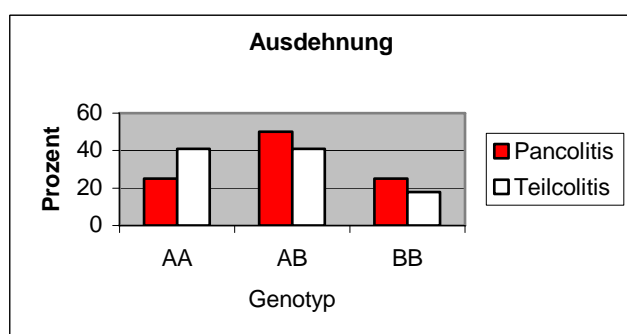


Abb. 3.10a/b Genotyp/Allelverteilung bei verschiedenen Ausdehnungen

3.2.5 Extraintestinale Manifestationen

Von 25 Patienten hatten acht (32 %) extraintestinale Manifestationen einer Colitis ulcerosa. Die Genotypverteilungen zwischen den Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (Tab. 3.23 und Abb. 3.11a), das Allel B kam häufiger in der Patientengruppe mit extraintestinalen Manifestationen vor (50 % vs. 38 %) (Tab. 3.24 und Abb. 3.11b), der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Tab. 3.23 Genotypverteilung bei Pat. mit/ohne EIM (%)

	Ja (n=08)	Nein (n=17)
AA	02 (25)	07 (41)
AB	04 (50)	07 (41)
BB	02 (25)	03 (18)

p=0.7

Tab. 3.24 Allelverteilung bei Pat. mit/ohne EIM (%)

	Ja	Nein
A	08 (50)	21 (62)
B	08 (50)	13 (38)

OR=1.6 [95 % CI: 0.49-5.36] p=0.43

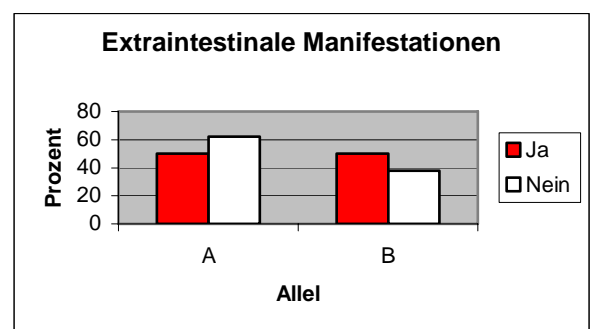
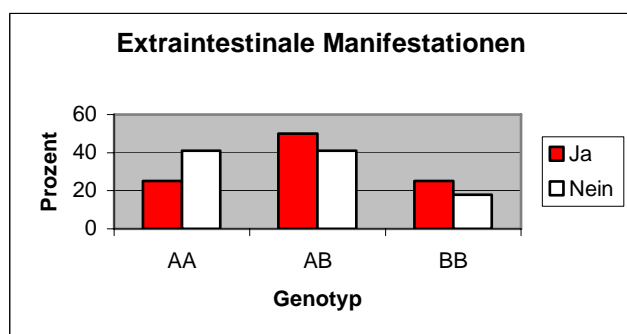


Abb. 3.11a/b Genotyp-/Allelverteilung bei Pat. mit/ohne EIM

3.2.6 Komplikationen

Der Großteil der Patienten (n=23, 92 %,) musste sich keiner erkrankungsbedingten Operation unterziehen bzw. hatte keine Komplikationen der Colitis ulcerosa. Nur zwei Patienten wurden mindestens einmal operiert oder hatten Komplikationen der Erkrankung (beide mit Genotyp AA) (Tab. 3.25 und Abb. 3.12a). Die Genotyp- und Allelfrequenzen in den beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab. 3.25/3.26 und Abb. 3.12b).

Tab. 3.25 Genotypverteilung bei Pat. mit/ohne Komplikationen (%)

	Ja (n=02)	Nein (n=23)
AA	02 (100)	07 (30)
AB	00 (00)	11 (48)
BB	00 (00)	05 (22)

p=0.2

Tab. 3.26 Allelverteilung bei Pat. mit/ohne Komplikationen (%)

	Ja	Nein
A	04 (100)	25 (54)
B	00 (00)	21 (46)

(OR= 0) [95 % CI: 0-∞] p=0.1

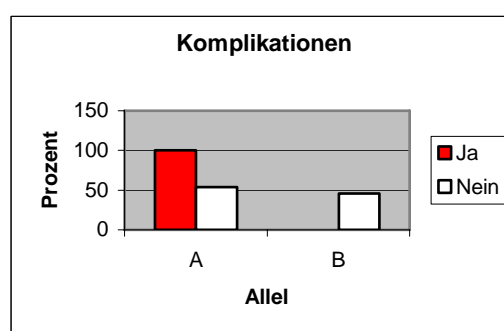
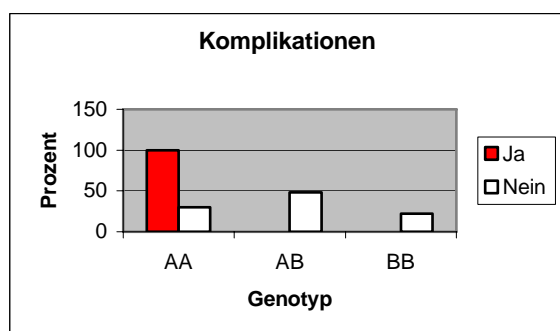


Abb. 3.12a/b Genotyp-/Allelverteilung bei Pat. mit/ohne Komplikationen

3.2.7 Immunsuppressiva

Fünf Patienten (20 %) mussten mit Immunsuppressiva behandelt werden (davon kein Patient mit Genotyp AB). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Genotypverteilungen gezeigt werden (Tab. 3.27 + Abb. 3.13a). Das Allel B kam nur marginal seltener bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie vor (40 % vs. 42 %) (Tab. 3.28 + Abb. 3.13b).

Tab. 3.27 Genotypverteilung bei Pat. mit/ohne Immunsuppressiva (%)

	Ja (n=05)	Nein (n=20)
AA	03 (60)	06 (30)
AB	00 (00)	11 (55)
BB	02 (40)	03 (15)

p=0.06

Tab. 3.28 Allelverteilung bei Patienten mit/ohne Immunsuppressiva (%)

	Ja	Nein
A	06 (60)	23 (58)
B	04 (40)	17 (42)

OR=0.9 [95 % CI: 0.22-3.70] p=0.99

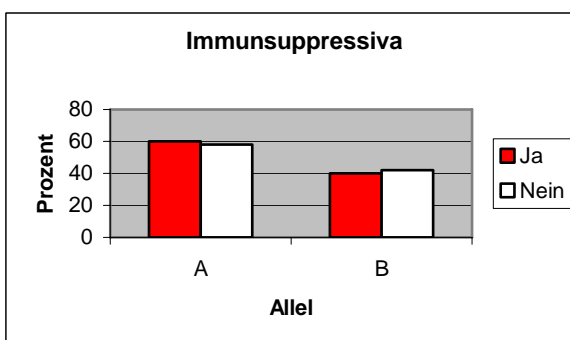
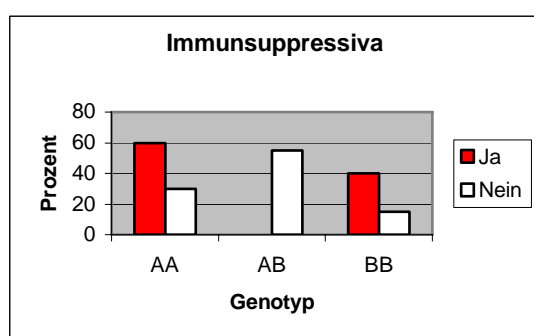


Abb. 3.13a/b Genotyp/Allelverteilung bei Pat. mit/ohne Immunsuppressiva

3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

1.

Das Allel B kam bei Patienten mit Colitis ulcerosa nicht signifikant seltener vor als bei gesunden Kontrollpersonen (42 % vs. 44 %).

2.

Patienten mit Genotyp BB hatten das jüngste Durchschnittsalter bei Erstdiagnose (29,8 Jahre), die Unterschiede zu den anderen Genotypen waren jedoch nicht signifikant.

3.

Das Allel B kam nicht signifikant häufiger bei Männern als bei Frauen vor (43 % vs. 40 %).

4.

Bei Patienten mit Pancolitis kam das Allel B nicht signifikant häufiger vor als bei Patienten mit lokal begrenzter Colitis (Teilcolitis) (50 % vs. 38 %).

5.

Bei Patienten mit extraintestinalen Manifestationen kam das Allel B nicht signifikant häufiger vor als bei Personen ohne extraintestinale Manifestationen (50 % vs. 38 %).

6.

Bei Patienten mit Komplikationen kam das Allel B nicht signifikant seltener vor als bei Patienten ohne Komplikation (0 % vs. 46 %).

7.

Bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie kam das Allel B nicht signifikant seltener vor als bei Patienten unter gewöhnlicher Glukokortikoid/5-ASA Therapie (40 % vs. 42 %).

4 Diskussion

4.1 Hsp70-2 PstI-Polymorphismus - Prävalenz bei CED

Ätiologie und Pathogenese von M. Crohn und Colitis ulcerosa sind komplex und noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Eine genetische Prädisposition in der Entwicklung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist aber aufgrund der familiären Häufung dieser Erkrankungen eine allgemein akzeptierte Tatsache [Satsangi et al. 1998]. Eine starke Assoziation des M. Crohn mit NOD2/Card15 auf Chromosom 16 konnte gezeigt werden [Ogura et al. 2001]. Genetische Untersuchungen an betroffenen Familien deuten auf eine zusätzliche Assoziation mit Chromosom 6 hin, so dass eine Beteiligung von MHC-codierten Genen nahe liegt, die auch in der Pathogenese anderer Erkrankungen involviert sind [Pugliese et al. 1992, Hampe et al. 1999]. Weitergehende Untersuchungen lieferten verschiedene HLA-II-Suszeptibilitätsgene für eine CED [Toyoda et al. 1993, Nakajima et al. 1995, Satsangi et al. 1998]. Genetische Studien über Assoziationen von Genpolymorphismen der HSP70-Genfamilie, von denen wichtige Vertreter ebenfalls innerhalb des MHC codiert sind [Milner und Campbell, 1990], mit Erkrankungsrisiko und Verlauf der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bei kaukasischen Patienten liegen bisher nicht vor. Bisherige Untersuchungen deuten auf eine Assoziation mit dem Krankheitsverlauf bei japanischen Patienten mit M. Crohn hin [Esaki et al. 1999]. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Auftreten eines Polymorphismus innerhalb der codierenden Sequenz des Hsp70-2 Gens, das für das stressinduzierbare Hsp72 codiert [Milner und Campbell, 1990] bei einem Kollektiv aus 61 kaukasischen Patienten mit einem bekannten M. Crohn untersucht. Das Durchschnittsalter dieser Patienten bei Erstdiagnose wich mit 27,2 Jahren etwas von dem in der Literatur beschriebenen Manifestationsaltersgipfel von 34,7 Jahren ab [Ekbohm et al. 1991]. Das Geschlechterverhältnis in der Gruppe zeigte ein Überwiegen von weiblichen Individuen (w:m; 1,4:1), was der allgemein höheren Prävalenz des M. Crohn bei Frauen entspricht [Ekbohm et al. 1991]. Der häufigste Genotyp innerhalb der Patientengruppe war AB (52 %), gefolgt von AA (30 %) und BB (18 %), dies ergab eine Häufigkeit des Allel A von 56 % und des Allel B von 44 %. Im Vergleich mit der gesunden, alters- und geschlechtsgematchten Kontrollgruppe (AA: 33 %, AB: 51 %, BB: 16 %) zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit M. Crohn und gesunden Personen.

Patienten mit Genotyp AB hatten das jüngste Durchschnittsalter bei Erstdiagnose (25 Jahre), gleichwohl ergaben sich keine signifikanten Differenzen zu den anderen Genotypen (AA: 31,1 Jahre), insbesondere hatten Patienten mit Genotyp BB nicht das jüngste Durchschnittsalter bei Erstdiagnose (BB: 27,3 Jahre). Ebenfalls liessen sich keine signifikanten Unterschiede in der Geschlechterverteilung zwischen Patienten mit Genotyp AA, AB und BB feststellen.

Diese Resultate werden gestützt von einer Studie an einem japanischen M. Crohn-Kollektiv. Bei Untersuchungen zur Prävalenz des selben Polymorphismus bei 108 japanischen Patienten mit M. Crohn konnten keine Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde auch keine Assoziation mit dem Alter bei Erstdiagnose und mit dem Geschlecht der Patienten gezeigt [Esaki et al. 1999]. Natürlich muss bedacht werden, dass hier zwei ethnische Gruppen miteinander verglichen werden, die sich in den genetischen Grundlagen einer CED unterscheiden könnten. Die Genotypprävalenzen bei japanischen Patienten (AA: 28 %, AB: 53 %, BB: 19 %) sind den Ergebnissen in dieser Arbeit jedoch ähnlich, so dass offensichtlich keine markanten Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz des PstI-Polymorphismus zwischen kaukasischen und japanischen Patienten bestehen. Ergänzend zu den M. Crohn-Patienten wurde ein Kollektiv von 25 Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht, um auch für diese andere Subgruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Informationen hinsichtlich der Häufigkeit des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus zu erhalten. Das Durchschnittsalter dieser Patienten bei Erstdiagnose entsprach mit 36,6 Jahren gut dem in der Literatur beschriebenen Wert von 39,8 Jahren [Ekblom et al. 1991]. Das Geschlechterverhältnis (m:w; 1.5:1) gab die höhere Prävalenz von Colitis ulcerosa bei Männern wieder [Ekblom et al. 1991]. Bei diesen Patienten war der häufigste Genotyp ebenfalls AB (AA: 36 %, AB: 44 %, BB: 20 %) und es bestanden auch hier nur geringe, nicht signifikante Differenzen zu den Kontrollpersonen (AA: 36 %, AB: 40 %, BB: 24 %). Für das Colitis ulcerosa-Kollektiv konnte keine Assoziation hinsichtlich des Erkrankungsrisikos, des Alters bei Erstdiagnose (AA: 37,2 Jahre, AB: 39,2 Jahre, BB: 29,8 Jahre) und der Geschlechterverteilung mit dem Polymorphismus festgestellt werden. Aufgrund der minimalen Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zu den M. Crohn-Patienten dürften keine signifikanten krankheitsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Genverteilung zwischen den beiden Entitäten bestehen.

Zusammengefasst lässt sich aus den Daten schließen, dass der Hsp70-2 PstI-Polymorphismus nicht für die Erkrankung an M. Crohn und Colitis ulcerosa prädisponiert. Ebenso wenig korreliert die Häufigkeit des PstI-Polymorphismus mit einer frühen Erstdiagnose der Erkrankung oder zeigt eine Bevorzugung eines Geschlechts. Es muss hier jedoch erwähnt werden, dass die Erstdiagnose der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen durch einen Arzt häufig nicht den eigentlichen Beginn der Erkrankung widerspiegelt, sondern der definitiven Diagnose längere Zeit Beschwerden vorausgehen können, die nicht als M. Crohn oder Colitis ulcerosa gedeutet werden [Adler, 1993].

Somit scheint dieser Hsp70-2-Polymorphismus nicht die Ursache der in der Literatur beschriebenen Assoziation der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mit Chromosom 6 zu sein [Hampe et al. 1999], andere Alternativen wären zum Beispiel der Haplotyp DR1/DQw5 bei M. Crohn oder DR2 bei Colitis ulcerosa [Toyoda et al. 1993]. Trotzdem darf damit eine Beteiligung des Polymorphismus im Verlauf der CED nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde weiterhin die Korrelation verschiedener anderer Charakteristika mit dem Genpolymorphismus untersucht.

4.2 Assoziation des Polymorphismus mit dem klinischen Verlauf

4.2.1 Ausdehnung und Lokalisation der Erkrankung

Ein Charakteristikum des M. Crohn ist der segmentale Befall der Darmschleimhaut (skip lesions). In den meisten Fällen ist das Ileum betroffen, was dem M. Crohn auch den Namen Ileitis terminalis gab. Die hier untersuchten M. Crohn-Patienten hatten in 80 % der Fälle eine Beteiligung des Ileums oder einen kombinierten Befall des Ileum und Colons. 20 % der Patienten hatten eine ausschließliche Beteiligung des Colons. Diese Verteilung weicht etwas von den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten eines isolierten Colonbefalls von 30,4 % und einer Ileum/Ileocolon-Beteiligung von 69,6 % ab [Farmer et al. 1975]. Bei den Patienten mit isolierter Colitis hatten Patienten mit Genotyp BB einen Anteil von 42 % (AA: 16 %, AB: 42 %), während dies bei Patienten mit Ileitis oder Ileocolitis nur 12 % (AA: 33 %, AB: 55 %) waren. Dies deutet auf die Assoziation einer isolierten Colitis mit Genotyp BB hin, wobei jedoch keine Signifikanz gezeigt werden konnte. Für das Allel B ergab sich eine signifikante Assoziation mit einer isolierten Colitis (Allel B: 62 % bei isolierter Colitis vs. 40 % bei Ileitis terminalis/Ileocolitis, $p=0.04$).

Für das Allel B wird die Assoziation mit einer verminderten Hsp72-Expression vermutet [Pociot et al. 1993], so dass angenommen werden kann, dass Träger dieses Allels aufgrund einer geringeren Mukosaprotektion einen ausgedehnteren Befall eines M. Crohn haben, was jedoch nicht den hier ermittelten Daten entspricht. Ein M. Crohn geringerer Ausdehnung muss jedoch nicht automatisch einen milderen Verlauf bedingen, da leicht vorstellbar ist dass eine schwere transmurale Darmentzündung bei einer isolierten Colitis eine heftigere klinische Symptomatik verursachen kann, als eine nur mäßige superfizielle Entzündung des gesamten Ileocolons. Vermutlich ist der Polymorphismus mit zusätzlichen genetischen Faktoren gekoppelt, die die Ausdehnung der Erkrankung beeinflussen. Welche dies in der komplexen Pathogenese des M. Crohn jedoch im Einzelnen sind, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Als Erklärung für die Signifikanz kommt aus statistischer Sicht auch ein Alpha-Fehler in Frage, zumal bei den multiplen statistischen Tests in dieser Arbeit die Wahrscheinlichkeit, einen solchen Fehler zu begehen, steigt [Trampisch und Windeler, 2000].

Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Esaki gestützt, der keine signifikante Assoziation mit der Ausdehnung zeigen konnte [Esaki et al. 1999].

Die Colitis ulcerosa ist gekennzeichnet durch eine Beschränkung der Entzündung auf das Colon, das Ileum ist selten im Sinn einer „Backwash-Ileitis“ beteiligt [Satsangi et al. 1998, Farmer et al. 1993]. Für das untersuchte Kollektiv wurde die Ausdehnung in Fälle von Pancolitis und lokal begrenzter Colitis eingeteilt. Acht Patienten hatten eine Pancolitis (32 %), während ein Großteil (17 Patienten) nur eine segmentale oder subtotale Colitis hatte. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur über die Häufigkeit einer Pancolitis von 36,7 % [Farmer et al. 1993]. Häufigster Genotyp bei den Patienten mit Pancolitis war AB (AA: 25 %, AB: 50 %, BB: 25 %), und damit nur gering different von Patienten mit lokal begrenzter Colitis (AA: 41 %, AB: 41 %, BB: 18 %). Das Allel B zeigte eine nicht signifikante Assoziation mit einer Pancolitis (50 % vs. 38 %). Diese Tendenz könnte Ausdruck der verminderten Expression von Hsp72 sein [Pociot et al. 1993], die einen Befall des gesamten Colons begünstigt. Dieser Effekt ist dann jedoch zu schwach, um einen signifikanten Unterschied zu bewirken.

4.2.2 Extraintestinale Manifestationen

Neben der Darmentzündung wird der Verlauf von M. Crohn und Colitis ulcerosa durch extraintestinale Manifestationen (EIM) wesentlich mitbestimmt [Greenstein et al. 1976]. Extraintestinale Manifestationen traten bei 27 Patienten (44 %) des untersuchten M. Crohn-Kollektivs auf. Im Vergleich dazu wird in der Literatur, abhängig von der Ausdehnung der Erkrankung eine Häufigkeit von 23-55 % angegeben [Greenstein et al. 1976, Veloso et al. 1996]. Häufigster Genotyp bei den betroffenen Patienten war AB mit 59 % (AA: 26 %, BB: 15 %). Im Vergleich mit Patienten ohne extraintestinale Manifestationen ergaben sich damit keine signifikanten Unterschiede (AA: 32 %, AB: 47 %, BB: 21 %) in Genotyp- und Allelverteilung. Sehr ähnliche Ergebnisse ergeben sich auch für die Colitis ulcerosa-Patienten (AA: 25 %, AB: 50 %, BB: 25 % bei Patienten mit EIM vs. AA: 41 %, AB: 41 %, BB: 18 % bei Patienten ohne EIM). Bei dieser Gruppe waren die extraintestinalen Manifestationen weniger häufig als bei M. Crohn-Patienten. Acht Patienten (32 %) litten an Manifestationen, in der Literatur wird über Prävalenzen von 25.8 % [Veloso et al. 1996] und 45 % [Greenstein et al. 1976] berichtet. Das Auftreten von extraintestinalen Manifestationen in Assoziation mit dem Hsp70-2 PstI-Polymorphismus bei CED wurde bisher nicht untersucht, so dass keine vergleichbaren Studien vorliegen. Pathogenetisch wird für viele dieser Erscheinungen eine Auslösung durch Streuung von Immunkomplexen vermutet, die unter anderem durch eine erhöhte Permeabilität der entzündeten Darmmukosa entstehen könnte [Greenstein et al. 1976, Veloso et al. 1996]. Hsp72 begrenzt durch seine mukosaprotektive Funktion [Musch et al. 1996, Wischmeier et al. 1997] den Schleimhautschaden und könnte damit dieser Streuung vorbeugen. Bei Assoziation mit einer verminderten Hsp72-Expression [Pociot et al. 1993], könnte das Allel B mit dem Auftreten von EIM assoziiert sein. Bei den untersuchten MC-Patienten kam das Allel B sowohl in der Gruppe mit EIM als auch bei Patienten ohne EIM gleich häufig vor (44 %). Bei Colitis ulcerosa-Patienten war das Allel B in der Gruppe mit EIM etwas häufiger als in der Gruppe ohne EIM (50 % vs. 38 %), eine Signifikanz liess sich jedoch nicht zeigen. Der PstI-Polymorphismus (Allel B) scheint nicht mit dem Auftreten von extraintestinalen Manifestationen assoziiert zu sein. Dies mag einerseits an einer mangelnden Hemmung der Streuung von Immunkomplexen liegen oder aber daran, dass in der Pathogenese der EIM noch andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen.

4.2.3 Intestinaler Verlauf und Therapie

Das Ausmaß der Darmentzündung bei M. Crohn ist sehr variabel, von leichter Entzündung der Mukosa bis hin zu schwerem transmuralen Befall der Darmwand [Price und Morson, 1975]. Klinische Studien ergaben zwei offensichtlich verschiedene Verlaufstypen eines M. Crohn, eine etwas mildere Verlaufsform ohne das Auftreten von Fisteln und Abszessen und der schwerere (komplizierte) Typ mit Ausbildung von intestinalen Fisteln, Perforationen und Abszessbildungen [Greenstein et al. 1988]. Neben dieser rein klinischen Unterscheidung wurden auch auf molekularer Ebene Unterschiede im Zytokinmuster bei den verschiedenen intestinalen Verlaufsformen gefunden [Gilberts et al. 1994]. Um eine Assoziation des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus mit einem der verschiedenen Verlaufstypen zu erkennen, wurde das Patientenkollektiv in die zwei Verlaufstypen eingeteilt [Greenstein et al. 1988]: Den Patienten mit Fistelbildungen (entero-enterale Fisteln, rektoanale Fisteln, Fisteln zu anderen Organen, freie Perforationen) und/oder Abszessbildungen wurden die übrigen Patienten gegenübergestellt. Insgesamt hatten in der untersuchten Gruppe 39 Patienten (64 %) einen schweren Verlaufstyp, in der Literatur wird ein Auftreten dieser Komplikationen in bis zu 47 % der Fälle beschrieben [Maeda et al. 1994]. Diese höhere Anzahl an Patienten mit kompliziertem Verlauf in dem untersuchten Kollektiv entspricht der Tatsache, dass die Gastroenterologische Ambulanz der Chirurgischen Klinik eine Spezialeinrichtung für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist, in der hauptsächlich schwere Fälle eines M. Crohn behandelt werden. Häufigster Genotyp bei den Patienten mit schwerem Verlauf war AB (51 %), gefolgt von BB (26 %) und AA (23 %). Im Gegensatz dazu hatte bei den Patienten mit milderem Verlauf nur ein einziger Patient (5 %) den Genotyp BB. Patienten mit Genotyp AA hatten in dieser Gruppe einen höheren Anteil von 41 % (AB: 54 %). Trotzdem konnte für diese Daten keine Signifikanz ($p=0,07$) gezeigt werden. Für das Allel B ergab sich jedoch eine signifikante Assoziation ($p=0,04$) mit einem komplizierten Verlauf eines M. Crohn. Bei den Patienten mit klinisch schwerem Verlauf hatte das Allel B eine Häufigkeit von 51 %, wohingegen es bei Patienten mit leichterem Verlauf nur eine Häufigkeit von 32 % hatte. Eine so hohe Rate an Komplikationen führte bei den untersuchten Patienten zu einer entsprechend hohen Operationshäufigkeit. 42 Patienten (69 %) des Kollektivs mussten sich mindestens einer erkrankungsbedingten Operation unterziehen.

In dieser Gruppe hatte der Genotyp BB eine Häufigkeit von 21 % (AA: 24 %, AB: 55 %), bei einem nicht signifikanten Unterschied zu den operationsfreien Patienten (AA: 42 %, AB: 47 %, BB: 11 %). Für das Allel B ergab sich damit eine Häufigkeit von 49 % bei operierten Patienten, während dies bei operationsfreien Patienten nur 34 % waren. Bei gleichen Tendenzen wie bei der Assoziation mit dem intestinalen Verlauf konnten hier jedoch keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

Eine weitere Behandlungsoption neben operativen Interventionen stellt die Therapie mit Immunsuppressiva dar [D'Haens et al. 1999, O'Brien et al. 1991]. In dieser Arbeit wurden Glukokortikoide als sehr häufig eingesetzte Medikamente nicht als Immunsuppressiva gewertet. 24 Patienten (39 %) wurden mit Medikamenten wie Azathioprin, Methotrexat, 6-Mercaptopurin oder TNF- α -Antikörpern (Infliximab) behandelt. Bei diesen Patienten war der häufigste Genotyp AB: 50 %, (AA: 33 %, BB: 17 %). Im Vergleich zu den nicht-immunsupprimierten Patienten (AA: 27 %, AB: 54 %, BB: 19 %) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, sowohl für Genotyp- als auch Allelverteilung. Die dargestellten Ergebnisse lassen sich gut mit den Ergebnissen einer Untersuchung bei japanischen Crohn-Patienten vereinbaren [Esaki et al. 1999]. Hier konnten für die verschiedenen Genotypen keine signifikanten Assoziationen mit dem intestinalen Verlauf festgestellt werden (AA: 14 %, AB: 55 %, BB: 31 % bei den Patienten mit schwererem Verlauf vs. AA: 33 %, AB: 52 % und BB: 15 %, bei milderem Verlauf; $p=0,06$) für das Allel B ergab sich jedoch auch bei Japanern eine signifikante positive Korrelation mit dem schweren klinischen Verlauf (B: 59 % vs. B: 41 %; $p=0,02$) [Esaki et al. 1999]. Bei den Patienten mit Operationen wurde ebenfalls ein nicht signifikant höherer Anteil des Allel B festgestellt (B: 47 % vs. B: 45 %). Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse, unabhängig von verschiedenen ethnischen Populationen, eine protektive Rolle des Allel A im Verlauf eines M. Crohn, während das Allel B für einen schweren Verlauf prädisponiert.

Eine interessante Frage ist nun, ob auch die intestinalen Komplikationen der Colitis ulcerosa (schwere Hämorrhagien, toxisches Megakolon mit/ohne Perforation) eine Assoziation mit dem Polymorphismus zeigen. Eine Untersuchung dieses Polymorphismus bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Im untersuchten Patientengut entwickelten nur zwei Patienten (8 %) entweder ein toxisches Megakolon oder mussten erkrankungsbedingt operiert werden, wobei beide Patienten den Genotyp AA hatten. Beim Vergleich der Genotyp- und Allelverteilungen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine immunsuppressive Therapie (Azathioprin, Methotrexat) benötigten fünf (20 %) der Patienten. Im Vergleich der Genotypen zeigten sich jedoch auch hier keine signifikanten Unterschiede (AA: 60 %, AB: 0 %, BB: 40 % bei Immunsupprimierten vs. AA: 30 %, AB: 55 %, BB: 15 % bei Nicht-Immunsupprimierten). Bei der Allelverteilung war in der Tat nur ein marginaler, nicht signifikanter Unterschied festzumachen (Allel B: 40 % bei Immunsupprimierten vs. 42 % bei Nicht-Immunsupprimierten). Eine Assoziation des Polymorphismus mit den intestinalen Komplikationen der Colitis ulcerosa scheint im Gegensatz zum M. Crohn hier nicht vorzuliegen, was die Hypothese bestärkt, dass es sich bei M. Crohn und Colitis ulcerosa um zwei distinkte Erkrankungsentitäten handelt [Toyoda et al. 1993, Satsangi et al. 1998]. Einschränkend ist hier natürlich die begrenzte Anzahl an untersuchten Patienten zu nennen, die eine valide Aussage erschwert.

Für die Ursache der Assoziation des Verlaufs eines M. Crohn mit dem Polymorphismus gibt es nun verschiedene Erklärungsansätze. Die protektive Funktion von Hsp72 wurde in verschiedenen Entzündungsmodellen mehrfach gezeigt [Jaquier-Sarlin et al. 1994, Van Molle et al. 2002]. Unter anderem wurde explizit in Darmmukosa eine schützende Funktion des Hsp72 nachgewiesen [Burress et al. 1997, Musch et al. 1996, Wischmeyer et al. 1997]. Wie erwartet können in der Darmmukosa von M. Crohn-Patienten erhöhte Konzentrationen an Hsp72 festgestellt werden [Ludwig et al. 1999]. Der Unterschied zu normaler Darmschleimhaut von gesunden Kontrollen ist jedoch nicht signifikant, was durch die ständige physiologische Reizung der Mukosa durch die Umgebung erklärt wird (bakterielle Darmflora, Bakterientoxine, etc.) [Ludwig et al. 1999].

Es ist nun vorstellbar, dass eine verminderte Induzierbarkeit der Hsp72-Produktion unter Entzündungsbedingungen wie sie bei M. Crohn herrschen zu stärkeren transmuralen Gewebeschäden und damit Entstehung von Fisteln und Abszessen führen. In der Tat ist die Hsp72-Expression in der Darmmukosa von Colitis ulcerosa-Patienten, bei der keine transmuralen Schäden gesehen werden, höher als bei M. Crohn-Patienten [Ludwig et al. 1999], bei denen häufig eine transmurale Entzündung des Darms zu finden ist [Price und Morson, 1975]. In einer Studie konnte eine Assoziation des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus (Allel B) mit einer geringeren Expressionsrate des Hsp72 gezeigt werden, was die Assoziation mit einem schweren klinischen Verlauf erklären könnte [Pociot et al. 1993]. Die untersuchte Fallzahl war jedoch gering (n=09) und die Unterschiede in den Expressionsraten nur marginal [Pociot et al. 1993]. Ebenso konnten umfangreichere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv keine signifikanten Unterschiede in der Expression zeigen [Schroeder et al. 2000]. Andererseits wurde die mRNA-Expression des Hsp72 in diesen Arbeiten nur in hitzegeschockten oder LPS-behandelten Leukozyten gemessen und es liegen keine Informationen zu der darmmukosaspezifischen Expression von Hsp72 in Abhängigkeit von dem Polymorphismus vor. Diese könnte von den bisherig gefundenen Ergebnissen abweichen, zumal die Hitzeschockgenexpression durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst wird und auch eine posttranskriptionelle Regelung gezeigt wurde [Nover, 1990 I, Kregel, 2002]. Eine alternative Erklärung für die Assoziation mit dem klinischen Verlauf könnte eine Genkoppelung des PstI-Polymorphismus mit einem oder weiteren Genen innerhalb des MHC sein, z. Bsp. TNF- α - oder HLA-Genpolymorphismen. In bisherigen Arbeiten konnte die Koppelung des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus (Allel A) mit einem Tumornekrosefaktor-Genpolymorphismus gezeigt werden [Schroeder et al. 1999, Stüber et al. 1996]. Dieser ist mit einer höheren TNF- α -Expression assoziiert und beeinflusst den klinischen Verlauf bei SIRS [Schroeder et al. 1999, Stüber et al. 1996]. TNF- α gilt als wichtiger pathogenetischer Faktor bei M. Crohn, da eine Behandlung mit Infliximab (ein TNF- α -Antikörper) zu einer Besserung der klinischen Symptomatik bei M. Crohn-Patienten führt [D'Haens et al. 1999]. Eine mögliche Beeinflussung des Verlaufs eines M. Crohn durch diesen TNF-Polymorphismus wurde noch nicht untersucht. Sollte dieses Gen jedoch mit dem in dieser Arbeit untersuchten Allel A gekoppelt sein, müssten Träger des Allel A aufgrund der höheren TNF- α -Expression einen schweren Verlauf eines M. Crohn haben. Allerdings zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse gerade eine protektive Rolle des Allel A im Verlauf eines M. Crohn.

Eine mögliche Erklärung für die Durchbrechung der Genkoppelung wären Crossing-over-Mechanismen bei den Patienten. Leider liegen nur unvollständige Daten zu der Wirksamkeit einer Remicade-Therapie bei den in dieser Arbeit untersuchten Personen vor. Es wäre insofern interessant zu wissen, ob Träger des Allel A besser auf eine Remicade-Therapie ansprechen. Neben TNF-Polymorphismen könnte auch eine Koppelung mit HLA-Genen vorliegen. Für HLA-B34 konnte eine negative Korrelation mit dem Auftreten von anorektalen Fisteln gezeigt werden [Bouma et al. 1998]. Ob dies zumindest zum Teil ein Linkage-Dysequilibrium mit dem in der vorliegenden Arbeit analysierten HSP70-Polymorphismus widerspiegelt, wurde noch nicht untersucht. Eine Genkoppelung mit HLA-DR3 konnte in einer früheren Arbeit gezeigt werden [Pugliese et al. 1992]. Weitere Genanalysen des MHC und die Identifikation von gekoppelten Haplotypen werden weitere Informationen über das für den klinischen Verlauf verantwortliche Kandidatengen liefern. Im Fall eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom) konnte im Gegensatz zum M. Crohn keine Auswirkungen des Hsp70-2 Polymorphismus auf den klinischen Verlauf ausgemacht werden [Schroeder et al. 1999], so dass in diesem Fall wahrscheinlich M. Crohn-spezifische Mechanismen involviert sind.

Diese Arbeit liefert weitere Einblicke in die Pathogenese des Morbus Crohn. Aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist der prädiktive Nutzen des untersuchten Genpolymorphismus für den Verlauf eines Morbus Crohn jedoch kritisch zu werten.

5. Zusammenfassung

Die genetischen Grundlagen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa sind komplex und noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Hitzeschockproteine (Hsp72) haben eine protektive Wirkung in entzündeter Darmmukosa. Daher könnte ein Mangel dieser Proteine den Verlauf inflammatorischer Darmerkrankungen beeinflussen. Zur Verifikation dieser Hypothese wurde die genomische DNA aus Leukozyten von 61 kaukasischen Patienten mit M. Crohn und 25 Patienten mit Colitis ulcerosa isoliert. Anschliessend wurde durch Polymerase-Kettenreaktion ein Segment des Hsp70-2 Gens amplifiziert, das einen A/G-Transitionspolymorphismus trägt (Allel B), der mit einer geringeren Hsp72-Expression assoziiert ist. Durch eine Restriktionsanalyse (Enzym: PstI) und konsekutiver Elektrophorese konnte das Vorliegen der Transition überprüft werden. Die aus den Krankenakten erhobenen Krankheitsverläufe (Alter bei Erstdiagnose, Ausdehnung und Lokalisation der Erkrankung, extraintestinale Manifestationen, Operationen, Komplikationen, Medikation) wurden mit den Ergebnissen der Genanalyse korreliert.

Das Allel B kam bei Patienten mit M. Crohn nicht signifikant häufiger vor als bei gesunden Personen (44 % bei Patienten vs. 42 % bei Gesunden). Die Resultate zeigten jedoch eine signifikante Assoziation ($p < 0.05$) dieses Polymorphismus mit einem schweren klinischen Verlauf eines M. Crohn, der durch das Auftreten von intestinalen Komplikationen (Fisteln, Darmperforationen und Abszessbildungen) gekennzeichnet ist (51 % bei Patienten mit Komplikationen vs. 32 % bei Patienten ohne Komplikationen). Für die Colitis ulcerosa konnten keine signifikanten Assoziationen, weder mit dem Erkrankungsrisiko noch mit dem klinischen Verlauf gezeigt werden.

Diese Daten liefern neue Informationen über genetische Einflüsse auf den Krankheitsverlauf bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Der prädiktive Wert des untersuchten Polymorphismus für den Verlauf des M. Crohn ist aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie und Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen jedoch schwierig abzuschätzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler G: Morbus Crohn, Colitis ulcerosa. Monographie
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1993
2. Anathan J, Goldberg AL, Voellmy R: Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*. 1986 Apr 25; 232(4749): 522-4
3. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*. 2000 Apr; 6(4): 435-42
4. Baca-Estrada ME, Gupta RS, Stead RH, Croitoru K: Intestinal expression and cellular immune response to human heat-shock protein 60 in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1994 Mar; 39(3): 498-506
5. Becker J, Craig EA: Heat-shock proteins as molecular chaperons. *Eur J Biochem*. 1994 Jan 15; 219(1-2): 11-23
6. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR: Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000 Aug; 2(8): 469-75
7. Bonen DK, Cho JH: The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2003 Feb; 124(2): 521-36
8. Botzler C, Issels R, Multhoff G: Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1996 Dec; 43(4): 226-30

9. Bouma G, Poen AC, Garcia-Gonzalez MA, Schreuder GM, Felt-Bersma RJ, Meuwissen SG, Pena AS: HLA-DRB1*03, but not the TNFA-308 promoter gene polymorphism, confers protection against fistulising Crohn's disease. *Immunogenetics*. 1998 May; 47(6): 451-55

10. Brown CR, Martin RL, Hansen WJ, Beckmann RP, Welch WJ: The constitutive and stress inducible forms of hsp70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *J Cell Biol*. 1993 Mar; 120(5): 1101-12

11. Bruemmer-Smith S, Stuber F, Schroeder S: Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensiv Care Med*. 2001 Dec; 27(12): 1835-41

12. Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M: Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*. 1992 Jul 15; 48(7): 629-34

13. Burress GC, Musch MW, Jurivich DA, Welk J, Chang EB: Effects of mesalamine on the hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 1997 Nov; 113(5): 1474-9

14. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl Acids Res*. 1992 Apr 11; 20(7): 1717-23

15. Craig E: Chaperones: helpers along the pathway to protein folding. *Science*. 1993 June 25; 260(5116): 1902-3

16. Del Giudice G: Hsp70: a carrier molecule with built-in adjuvanticity. *Experientia*. 1994 Nov 30; 50(11-12): 1061-6

17. D'Haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, Chalmers D, Kothe C, Baert F, Braakman T, Schaible T, Geboes K, Rutgeerts P: Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A european multicenter trial. *Gastroenterology*. 1999 May; 116(5): 1029-34

18. De Nagel DK, Pierce SK: A case for chaperons in antigen processing. *Mol Cell Biol.* 1993 Jun;13(6): 3598-610.
19. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology.* 1991 Feb; 100(2): 350-8
20. Ellis RJ: Proteins as molecular chaperones. *Nature.* 1987 Jul 30-Aug 5; 328: 378-9
21. Ellis RJ, van der Vies SM: Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60: 321-47
22. Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM: The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp.* 1989; 55: 145-53
23. Esaki M, Furuse M, Matsumoto T, Aoyagi K, Jo Y, Yamagata H, Nakano H, Fujishima M: Polymorphism of heat-shock protein gene HSP70-2 in Crohn disease: possible genetic marker for two forms of Crohn disease. *Scand J Gastroenterol.* 1999 Jul, 34(7): 703-7
24. Farmer RG, Easley KA, Rankin GB: Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci.* 1993 Jun; 38(6): 1137-46
25. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr: Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology.* 1975 Apr; 68(4 Pt 1): 627-35
26. Feige U, Polla BS: Heat shock proteins: Hsp70-a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia.* 1994 Nov 30; 50(11-12): 979-86
27. Georgopolous C, Welch WJ: Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol.* 1993; 9: 601-34
28. Gilberts EC, Greenstein AJ, Katsel P, Harpaz N, Greenstein RJ: Molecular evidence for two forms of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Dec 20; 91(26): 12721-4

29. Greenstein AJ, Lachmann P, Sachar DB, Springhorn J, Heimann T, Janowitz HD, Aufses AH Jr: Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut*. 1988 May; 29(5): 588-92
30. Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB: The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine*. 1976; 55: 401-412
31. Gross M, Rötzer E: Rapid DNA extraction method for genetic screening. *Eur J Med Res*. 1998 Mar 23; 3(3): 173-5
32. Günther E, Walter L: Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia*. 1994 Nov 30; 50(11-12): 987-1001
33. Hainaut P, Milner J: Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro: evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. *EMBO J*. 1992 Oct;11(10): 3513-20
34. Hall TJ: Role of hsp70 in cytokine production. *Experientia*. 1994 Nov 30; 50(11-12): 1048-53
35. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJS, Cardon LR, et al: A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large european cohort. *Am J Hum Genet*. 1999; 64: 808-816
36. Heydari AR, Takahashi R, Gutschmann S, You S, Richardson A: Hsp70 and aging. *Experientia*. 1994 Nov 30; 50(11-12): 1092-8
37. Hunt G, Morimoto RI: Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Oct; 82(19): 6455-59
38. Jaattela M, Saksela K, Saksela E: Heat shock protects WEHI-164 target cells from the cytotoxicity by tumor necrosis factors alpha and beta. *Eur J Immunol*. 1989 Aug; 19(8): 1413-17

39. Jaquier-Sarlin MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT, Richard MJ, Polla BS: Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia*. 1994 Nov 30; 50(11-12): 1031-8
40. Jolly C, Morimoto RI: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Oct 4; 92(19): 1564-72
41. Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N: Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*. 1990 Nov 8; 348(6297): 137-43
42. Kregel KC: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress response and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 2002 May; 92(5): 2177-86
43. Ludwig D, Stahl M, Ibrahim ET, Wenzel BE, Drabicki D, Wecke A, Fellermann K, Stange EF: Enhanced intestinal expression of heat shock protein 70 in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1999 Jul; 44(7): 1440-7
44. Maeda K, Okada M, Yao T, Sakurai T, Iida M, Fuchigami T, Yoshinaga K, Imamura K, Okada Y, Sakamoto K, et al: Intestinal and extraintestinal complications of Crohn's disease: predictors and cumulative probability of complications. *J Gastroenterol*. 1994 Oct; 29(5): 577-82
45. Maresca B, Kobayashi GS: Hsp70 in parasites: as an inducible protein and as an antigen. *Experientia*. 1994 Nov 30; 50(11-12): 1067-74
46. Markesich DC, Sawai ET, Butel JS, Graham DY: Investigations on etiology of Crohn's disease. Humoral immune response to stress (heat shock) proteins. *Dig Dis Sci*. 1991 Apr; 36(4): 454-60
47. Milner CM, Campbell RD: Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*. 1990; 32(4): 242-51

48. Milner CM, Campbell RD: Polymorphic analysis of three MHC-linked HSP70 genes. Immunogenetics. 1992; 36(6): 357-62
49. Minota S, Cameron B, Welch WJ, Winfield JB: Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. J Exp Med. 1988 Oct 1; 168(4): 1475-80
50. Morimoto RI, Milarski KL: Expression and function of vertebrate hsp70 genes. In: Stress proteins in Biology and Medicine, 323-359. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopolous C (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1990
51. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Monograph 26. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1994
52. Morshauser RC, Hu W, Wang H, Pang Y, Flynn GC, Zuiderweg ER: High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. J Mol Biol. 1999 Jun 25; 289(5): 1387-403
53. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B: Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol. 1997 Sep; 17(9): 5317-27
54. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986; 51 Pt 1: 263-73
55. Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R: Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. J Immunol. 1997 May 1; 158(9): 4341-50
56. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD: A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. Int J Cancer. 1995; 61: 272-279

57. Musch WM, Ciancio MJ, Sarge K, Chang EB: Induction of heat shock protein 70 protects intestinal IEC-18 cells from oxidant and thermal injury. *Am J Physiol.* 1996 Feb; 270(2 Pt 1): C429-36
58. Nakajima A, Matsushashi N, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Kimura A: HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1995; 109: 1462-1467
59. Nover L: Expression of heat shock genes in homologous and heterologous systems. *Enz Microb Technol.* 1987; 9: 130-144
60. Nover L: Molekulare Zellbiologie der Hitzestreßantwort, Teil I. *Naturwissenschaften* 1990 Jul; 77(7): 310-6
61. Nover L: Molekulare Zellbiologie der Hitzestreßantwort, Teil II. *Naturwissenschaften.* 1990 Aug; 77(8): 359-65
62. Nover L: Hitzestreßproteine und Transkriptionsfaktoren im Rampenlicht. *Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie e.V.* 1994; 20. Jahrgang 3/94: 10-13
63. O'Brien JJ, Bayless TM, Bayless JA: Use of azathioprine or 6-mercaptopurin in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1991 Jul; 101(1): 39-46
64. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001 May 31; 411(6837): 603-6.
65. Osipiuk J, Walsh MA, Freeman BC, Morimoto RI, Joachimiak A: Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1999 May; 55(5): 1105-7

66. Pablos JL, Carreira PE, Martin-Villa JM, Montalvo G, Arnaiz-Villena A, Gomez-Reino JJ.: Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1995 Aug; 34(8): 721-364.
67. Papadakis KR, Targan SR: Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med.* 2000; 51: 289-98
68. Pelham HR: A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell.* 1982 Sep; 30(2): 517-28
69. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M: Specific interaction between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock proteins. *Nature.* 1986 Mar 13-19; 320(6058): 182-4
70. Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L: Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 2001 May; 15(7): 1118-31
71. Pociot F, Ronningen KS, Nerup J: Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol.* 1993 Nov; 38(5): 491-5
72. Pockley AG: Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or agents ? *Expert Rev Mol Med.* 2001 Sep 21, 2001: 1-21
73. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM: Detection of heat shock protein (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest.* 1998 Dec; 27(6): 367-77
74. Price AB, Morson BC: Inflammatory bowel disease: the surgical pathology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Pathol.* 1975 Jan; 6(1): 7-29
75. Prohaszka Z, Singh M, Nagy K, Kiss E, Lakos G, Duba J, Fust G: Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. *Cell Stress Chaperones.* 2002 Jan; 7(1): 17-22

76. Pugliese A, Awdeh Z, Galluzzo A, Yunis EJ, Alper CA, Eisenbarth GS: No independent association between HSP70 gene polymorphism and IDDM. *Diabetes*. 1992 Jul; 41(7): 788-91
77. Res PC, Thole JER, de Vries RR: Heat shock proteins in immunopathology. *Curr Opin Immunol*. 1991 Dec; 3(6): 924-9
78. Reumaux D, Meziere C, Colombel JF, Duthilleul P, Mueller S: Distinct production of auto-antibodies to nuclear components in ulcerative colitis and in Crohn's disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Dec; 77(3): 349-57
79. Ritossa F: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962; 18: 571-3
80. Salvetti M, Ristori G, Buttinelli, Fiori P, Falcone M, Britton W, Adams E, Paone G, Grasso MG, Pozzilli C. The immune response to mycobacterial 70-kDa heat shock proteins frequently involves autoreactive T cells and is quantitatively dysregulated in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1996 Apr; 65(2): 143-53
81. Satsangi J, Parkes M, Jewell DP, Bell JI: Genetics of inflammatory bowel disease. *Clin Sci*. 1998 May; 94(5): 473-8
82. Schmidt JA, Abdulla E: Down-regulation of IL-1 β biosynthesis by inducers of the heat-shock-response. *J Immunol*. 1988 Sep 15; 141(6): 2027-34
83. Schreiber S, Schottelius A: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: *Pathophysiologie*. (Hrsg) Fölsch, UR, Kochsiek, K, Schmidt, RF. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2000
84. Schroeder S, Reck M, Hoeft A, Stüber F: Analysis of two HLA-linked polymorphic heat shock protein 70 genes in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 1999 Jul; 27(7): 1265-70
85. Schroeder S, Reck M, Lehmann E, Book M, Hoeft A, Stüber F: The PstI polymorphism of the endotoxin-inducible heat-shock protein 70-2 gene does not affect messenger RNA level in human whole-blood cultures. *Intensive Care Med*. 2000; 26 (8): 1139-43

86. Smith DI, Blattner FR, Davies J: The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from *Providencia stuartii*. Nucl Acids Res. 1976; 3(2): 2343-53
87. Sorger PK, Pelham HRB: Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells. EMBO J. 1987 Apr; 6(4): 993-8
88. Stahl M, Ludwig D, Fellerman K, Stange EF: Intestinal expression of human heat shock protein 90 in patients with Crohn´s disease and ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 1998 May; 43(5): 1079-87
89. Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U : A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. Crit Car Med. 1996 Mar; 24(3): 381-4
90. Stulik J, Bures J, Pavel J, Langr F, Kovarova H, Macela A: The different expression of proteins recognized by monoclonal anti-heat shock protein 70 (hsp70) antibody in human colonic diseases. Electrophoresis. 1997 Mar-Apr; 18(3-4): 625-8
91. Sztankay A, Trieb K, Grubeck-Lobenstein B: Die Rolle von Stressproteinen in der Medizin. Hautarzt. 1993; 44: 811-818
92. Terlecky SR: HSP70 and lysosomal proteolysis. Experienta. 1994 Nov; 50(11-12): 1021-5
93. Terlecky SR, Chiang HL, Olson TS, Dice JF: Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. J Biol Chem. 1992 May 5; 267(13): 9202-9
94. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM: Protein synthesis in salivary gland of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. J Mol Biol. 1974 Apr 15; 84(3): 389-98
95. The Worl Medical Association: Declaration of Helsinki. J Postgrad Med. 2002 Jul-Sep; 48(3): 206-8

96. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppaciario A, Vile R: Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol.* 1999 Aug 1; 163(3): 1398-408

97. Toyoda H, Wang SJ, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, McElree CK, Pressman SR, Shanahan F, Targan SR, et al: Distinct associations of HLA class genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1993 Mar; 104(3): 741-8

98. Trampisch H, Windeler J: Medizinische Statistik. Monographie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2000

99. Van Eden W, Van Zee R, Paul AGA, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, Wauben MHM: Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases ? *Immunol Today.* 1998 July; 19(7): 303-7

100. Van Molle W, Wielockx B, Mahieu T, Takada M, Taniguchi T, Sekikawa K, Libert C: HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity.* 2002 May; 16(5): 685-95

101. Veloso FT, Carvalho J, Magro F: Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol.* 1996 Jul; 23(1): 29-34

102. Walter L, Rauh F, Günther E: Comparative analysis of the three major histocompatibility complex-linked Hsp70 genes of the rat. *Immunogenetics.* 1994; 40(5): 325-30

103. Weiß C: Basiswissen Medizinische Statistik. Monographie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2002

104. Welch WJ: Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 1992 Oct; 72(4): 1063-81

105. Winrow VR, Mojdehi GM, Ryder SD, Rhodes JM, Blake DR, Rampton DS: Stress proteins in colorectal mucosa. Enhanced expression in ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 1993 Nov ; 38(11): 1994-2000
106. Wischmeyer PE, Musch MW, Madonnna MB, Thisted R, Chang EB: Glutamine protects intestinal epithelial cells: Role of inducible HSP70. Am J Physiol. 1997 Apr; 272(4 Pt 1): G879-84
107. Yang XD, Feige U: Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy ? Experientia. 1992 Jul 15; 48(7): 650-6

Prüfprotokoll_(MC)

Genotyp und Allelverteilung bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollpersonen mittels χ^2 -Test für RXC- bzw. Vierfeldertafeln.

Expected	Patienten	Kontrollpers.	
AA	18,91	18,91	
AB	31,72	31,72	
BB	10,37	10,37	
	61	61	

Observed	Patienten	Kontrollpers.	
AA	18	20	
AB	32	31	
BB	11	10	
	61	61	

p-value= 0.9153

Expected	Patienten	Kontrollpers.	
A	69,54	69,54	
B	52,46	52,46	
	122	122	

Observed	Patienten	Kontrollpers.	
A	68	71	
B	54	51	
	122	122	

p-value= 0.6980

Prüfprotokoll_(MC)

Altersverteilung

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Altersverteilung zwischen den verschiedenen Genotypen mittels ANOVA.

ANOVA: Results

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	148.0	2	74.00	0.3711
error	1.1565E+04	58	199.4	
total	1.1713E+04	60		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.692

Group A: Number of items= 18

18.0 26.0 26.0 29.0 29.0 30.0 31.0 33.0 35.0 35.0 45.0 47.0 49.0 52.0 56.0 58.0 72.0 82.0

Mean = 41.8

95% confidence interval for Mean: 35.17 thru 48.50

Standard Deviation = 17.2

Hi = 82.0 Low = 18.0

Median = 35.0

Average Absolute Deviation from Median = 13.3

Group B: Number of items= 32

21.0 22.0 22.0 26.0 27.0 29.0 30.0 32.0 33.0 33.0 34.0 34.0 34.0 35.0 35.0 36.0 36.0 37.0 37.0 37.0
37.0 38.0 39.0 41.0 45.0 46.0 47.0 48.0 57.0 58.0 62.0 76.0

Mean = 38.2

95% confidence interval for Mean: 33.25 thru 43.25

Standard Deviation = 12.0

Hi = 76.0 Low = 21.0

Median = 36.0

Average Absolute Deviation from Median = 8.06

Group C: Number of items= 11

22.0 24.0 27.0 29.0 36.0 36.0 38.0 50.0 52.0 55.0 67.0

Mean = 39.6

95% confidence interval for Mean: 31.11 thru 48.16

Standard Deviation = 14.5

Hi = 67.0 Low = 22.0

Median = 36.0

Average Absolute Deviation from Median = 11.3

Prüfprotokoll_(MC)

Altersverteilung bei Erstdiagnose

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Altersverteilung bei Erstdiagnose zwischen den verschiedenen Genotypen mittels ANOVA.

ANOVA: Results

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	418.1	2	209.1	1.370
error	8848.	58	152.6	
total	9266.	60		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.262

Group A: Number of items= 18

14.0 15.0 17.0 17.0 20.0 21.0 22.0 22.0 24.0 26.0 28.0 29.0 34.0 44.0 47.0 47.0 57.0 75.0

Mean = 31.1

95% confidence interval for Mean: 25.23 thru 36.88

Standard Deviation = 16.6

Hi = 75.0 Low = 14.0

Median = 25.0

Average Absolute Deviation from Median = 11.9

Group B: Number of items= 32

9.00 9.00 13.0 15.0 16.0 17.0 17.0 18.0 18.0 19.0 20.0 21.0 21.0 21.0 22.0 24.0 25.0 26.0 26.0 27.0
29.0 30.0 30.0 31.0 32.0 32.0 33.0 33.0 35.0 39.0 40.0 53.0

Mean = 25.0

95% confidence interval for Mean: 20.66 thru 29.40

Standard Deviation = 9.54

Hi = 53.0 Low = 9.00

Median = 24.5

Average Absolute Deviation from Median = 7.53

Group C: Number of items= 11

15.0 19.0 19.0 20.0 21.0 24.0 27.0 27.0 31.0 46.0 51.0

Mean = 27.3

95% confidence interval for Mean: 19.82 thru 34.73

Standard Deviation = 11.5

Hi = 51.0 Low = 15.0

Median = 24.0

Average Absolute Deviation from Median = 8.00

Prüfprotokoll_(MC)

Geschlechterverteilung

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Frauen und Männern mittels χ^2 -Test für RXC- bzw. Vierfeldertafeln.

Expected	Männer	Frauen	
AA	7,8	10,5	
AB	13,52	18,2	
BB	4,68	6,3	
	26	35	

Observed	Männer	Frauen	
AA	8	10	
AB	12	20	
BB	6	5	
	26	35	

p-value= 0.6009

Expected	Männer	Frauen	
A	29,12	39,2	
B	22,88	30,8	
	52	70	

Observed	Männer	Frauen	
A	28	40	
B	24	30	
	52	70	

p-value= 0.7133

Prüfprotokoll_(MC)

Ausdehnung und Lokalisation der Erkrankung

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit Ileitis/Ileocolitis und Colitis mittels Fishers exaktem Test bzw. χ^2 -Test für Vierfeldertafeln.

	Ileitis/Ileocolitis (n=08)	Colitis (n=17)
AA	16	2
AB	27	5
BB	6	5

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.0839

Expected	Ileitis/Ileocolitis	Colitis
A	55,86	13,68
B	42,14	10,32
	98	24

Observed	Ileitis/Ileocolitis	Colitis
A	59	9
B	39	15
	98	24

p-value= 0.0420

Prüfprotokoll_(MC)

Extraintestinale Manifestationen

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ohne extraintest. Manifest. mittels Fishers exaktem Test bzw. Chi²-Test für Vierfeldertafeln.

	Ja (n=27)	Nein (n=34)
AA	7	11
AB	16	16
BB	4	7

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.6495

Expected	Ja	Nein
A	30,24	38,08
B	23,76	29,92
	54	68

Observed	Ja	Nein
A	30	38
B	24	30
	54	68

p-value= 0.9453

Prüfprotokoll_(MC)

Intestinaler Verlauf

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ohne Komplikationen mittels Fishers exaktem Test bzw. Chi²-Test für Vierfeldertafeln.

	P (n=39)	NP (n=22)
AA	9	9
AB	20	12
BB	10	1

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.0680

Expected	Ja	Nein	
A	43,68	24,64	
B	34,32	19,36	
	78	44	

Observed	Ja	Nein	
A	38	30	
B	40	14	
	78	44	

p-value= 0.0375

Prüfprotokoll_(MC)

Operationen

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ohne Operationen mittels Fishers exaktem Test bzw. Chi²-Test für Vierfeldertafeln.

	Ja (n=42)	Nein (n=19)
AA	10	8
AB	23	9
BB	9	2

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.3415

Expected	Ja	Nein
A	47,04	21,28
B	36,96	16,72
	84	38

Observed	Ja	Nein
A	43	25
B	41	13
	84	38

p-value= 0.1322

Prüfprotokoll_(MC)

Immunsuppressiva

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ohne Immunsuppressiva mittels Fishers exaktem Test bzw. χ^2 -Test für Vierfeldertafeln.

	Ja (n=24)	Nein (n=37)
AA	8	10
AB	12	20
BB	4	7

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.8828

Expected	Ja	Nein
A	26,88	41,44
B	21,12	32,56
	48	74

Observed	Ja	Nein
A	28	40
B	20	34
	48	74

p-value= 0.6392

Prüfprotokoll_(CU)

Genotyp und Allelverteilung bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollpersonen mittels χ^2 -Test für RxC- bzw. Vierfeldertafeln.

Expected	Patienten	Kontrollpers.
AA	9	9
AB	10,5	10,5
BB	5,5	5,5
	25	25

Observed	Patienten	Kontrollpers.
AA	9	9
AB	11	10
BB	5	6
	25	25

p-value= 0.9331

Expected	Patienten	Kontrollpers.
A	28,5	28,5
B	21,5	21,5
	50	50

Observed	Patienten	Kontrollpers.
A	29	28
B	21	22
	50	50

p-value= 0.8399

Prüfprotokoll_(CU)

Altersverteilung

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Altersverteilung zwischen den verschiedenen Genotypen mittels ANOVA.

ANOVA: Results

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	311.1	2	155.6	1.256
error	2724.	22	123.8	
total	3035.	24		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.304

Group A: Number of items= 9

32.0 34.0 34.0 41.0 53.0 55.0 58.0 66.0 67.0

Mean = 48.9

95% confidence interval for Mean: 41.20 thru 56.58

Standard Deviation = 13.9

Hi = 67.0 Low = 32.0

Median = 53.0

Average Absolute Deviation from Median = 11.7

Group B: Number of items= 11

30.0 36.0 44.0 45.0 49.0 49.0 51.0 52.0 55.0 58.0 63.0

Mean = 48.4

95% confidence interval for Mean: 41.41 thru 55.32

Standard Deviation = 9.45

Hi = 63.0 Low = 30.0

Median = 49.0

Average Absolute Deviation from Median = 6.82

Group C: Number of items= 5

31.0 35.0 38.0 42.0 53.0

Mean = 39.8

95% confidence interval for Mean: 29.48 thru 50.12

Standard Deviation = 8.41

Hi = 53.0 Low = 31.0

Median = 38.0

Average Absolute Deviation from Median = 5.80

Prüfprotokoll_(CU)

Altersverteilung bei Erstdiagnose

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Altersverteilung zwischen den verschiedenen Genotypen mittels ANOVA.

ANOVA: Results

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	308.0	2	154.0	1.217
error	2784.	22	126.5	
total	3092.	24		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.315

Group A: Number of items= 9

19.0 21.0 29.0 36.0 37.0 43.0 48.0 48.0 54.0

Mean = 37.2

95% confidence interval for Mean: 29.45 thru 45.00

Standard Deviation = 12.3

Hi = 54.0 Low = 19.0

Median = 37.0

Average Absolute Deviation from Median = 9.78

Group B: Number of items= 11

23.0 23.0 28.0 33.0 37.0 40.0 42.0 43.0 53.0 53.0 56.0

Mean = 39.2

95% confidence interval for Mean: 32.15 thru 46.22

Standard Deviation = 11.7

Hi = 56.0 Low = 23.0

Median = 40.0

Average Absolute Deviation from Median = 9.36

Group C: Number of items= 5

20.0 26.0 32.0 33.0 38.0

Mean = 29.8

95% confidence interval for Mean: 19.37 thru 40.23

Standard Deviation = 6.94

Hi = 38.0 Low = 20.0

Median = 32.0

Average Absolute Deviation from Median = 5.00

Prüfprotokoll_(CU)

Geschlechterverteilung

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Männern und Frauen mittels Fishers exaktem Test bzw. χ^2 -Test für Vierfeldertafeln.

	Männer (n=15)	Frauen (n=10)
AA	5	4
AB	7	4
BB	3	2

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value ≈ 1

Expected		Männer	Frauen
	A	17,4	11,6
	B	12,6	8,4
		30	20

Observed		Männer	Frauen
	A	17	12
	B	13	8
		30	20

p-value = 0.8150

Prüfprotokoll_(CU)

Ausdehnung und Lokalisation der Erkrankung

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit Pancolitis/Teilcolitis mittels Fishers exaktem Test bzw. χ^2 -Test für Vierfeldertafeln.

	Pancolitis (n=08)	Teilcolitis (n=17)
AA	2	7
AB	4	7
BB	2	3

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.7437

Expected

	Pancolitis	Teilcolitis
A	9,28	19,72
B	6,72	14,28
	16	34

Observed

	Pancolitis	Teilcolitis
A	8	21
B	8	13
	16	34

p-value= 0.4334

Prüfprotokoll_(CU)

Extraintestinale Manifestationen

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ ohne extraint. Manifest. mittels Fishers exaktem Test bzw. χ^2 -Test für Vierfeldertafeln.

	Ja (n=08)	Nein (n=17)
AA	2	7
AB	4	7
BB	2	3

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.7437

Expected		Ja	Nein
	A	9,28	19,72
	B	6,72	14,28
		16	34

Observed		Ja	Nein
	A	8	21
	B	8	13
		16	34

p-value= 0.4334

Prüfprotokoll_(CU)

Komplikationen und Operationen

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ ohne Komplikationen/Operationen mittels Fishers exaktem Test bzw. χ^2 -Test für Vierfeldertafeln.

	Ja (n=02)	Nein (n=23)
AA	2	7
AB	0	11
BB	0	5

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.1533

	Ja	Nein
A	4	25
B	0	21

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.1291

Prüfprotokoll_(CU)

Immunsuppressiva

Signifikanztestung des Unterschiedes in der Genotyp/Allelverteilung zwischen Patienten mit/ohne Immunsuppressiva mittels Fishers exaktem Test.

	Ja (n=05)	Nein (n=20)
AA	3	6
AB	0	11
BB	2	3

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.0578

	Ja	Nein
A	6	23
B	4	17

Fishers exakter Test:

Two sided p-value for $p(O \geq E / O \leq E)$:

p-value= 0.9999

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. biol. hum. M. Gross für die Betreuung und Leitung meiner Dissertationsarbeit. Darüberhinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. Schlöndorff für die Bereitstellung eines molekularbiologischen Arbeitsplatzes und der Mittel zur Durchführung der Versuche. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. W. Mutschler für die Erlaubnis der Durchführung der Untersuchung an Patienten der Chirurgischen Klinik der Universität München.

Besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. med. U. Schiemann für die engagierte Mitbetreuung und stete Hilfe bei aller Art von Problemen.

Desweiteren möchte ich mich bei folgenden Personen herzlich bedanken:

Herrn Dr. med. U. Seybold für sein unverzichtbares Know-How und hilfreiche Ratschläge.

Fr. Diplom-Chemikerin P. Kölle für Ihre Ratschläge und Mithilfe bei technischen Problemen aller Art.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Debler
Vorname:	Jens
Geburtsdatum und -ort:	20.05.1975 in Ochsenhausen
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	deutsch

Schullaufbahn

1982 - 1984	Grundschule Warthausen
1984 - 1986	Grundschule Schemmerhofen
1986 - 1995	Pestalozzi-Gymnasium Biberach
	Abitur: Note 1,9

Zivildienst

07.1995 - 08.1996	Rettungssanitäter, DRK Biberach
-------------------	---------------------------------

Hochschulbildung

SS 1997 - WS 1999	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen	
WS 1998 - WS 1999	Studium der Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen	
SS 2000 - WS 2003	Studium der Humanmedizin, LMU München	
03.1999	Ärztl. Vorprüfung, EKU Tübingen	Note 1,3
03.2000	1. Staatsexamen, EKU Tübingen	Note 1,0
07.2001	Benjamin-Franklin-Contest, FU Berlin	2. Platz
10.2001 - 01.2002	Assistent im Präparierkurs, LMU München	
09.2002	2. Staatsexamen, LMU München	Note 1,3
10.2002	USMLE Step I, München	Score 97
03.2003	USMLE Step II, München	Score 88
10.2003	3. Staatsexamen, LMU München	Note 1,0

Famulaturen

08.1999	Chirurgische Klinik, Kreiskrankenhaus Friedrichshafen
03.2001	Internistische Klinik, Rotkreuzkrankenhaus München
08.2001	Allgemeinmedizin, JVA Stadelheim
03.2002	Dermatologische Klinik, LMU München

Praktisches Jahr

10.2002 - 02.2003	1. Tertial: Dermatologische Universitätsklinik, LMU
02.2003 - 04.2003	2. Tertial: Chirurgische Universitätsklinik Innenstadt, LMU
04.2003 - 06.2003	2. Tertial: Departement of Surgery Concord Hospital, Sydney
06.2003 - 09.2003	3. Tertial: Medizinische Klinik, Universitätsklinik Basel

Dissertationsarbeit

Seit 05.2001	„Assoziation des Hsp70-2 PstI-Polymorphismus mit dem Krankheitsverlauf bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa“ Medizinische Poliklinik Innenstadt LMU, Prof. Dr. Dr. Gross unmittelbarer Betreuer, Dr. U. Schiemann
--------------	--

Berufstätigkeit

Seit 11.2003	Assistenzarzt, Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Regensburg
--------------	--

Regensburg, 14.08.2005